

# Europos Sąjungos oficialusis leidinys

L 284



Leidimas  
lietuvių kalba

## Teisės aktai

54 tomas

2011 m. spalio 31 d.

Turinys

### II Įstatymo galios neturintys teisės aktai

#### REGLAMENTAI

- ★ 2011 m. spalio 20 d. Tarybos reglamentas (ES) Nr. 1071/2011 kuriuo panaikinamas Reglamentas (EEB) Nr. 3448/80 dėl 1979 m. Stojimo akto 43 straipsnio dėl prekybos sistemos, taikomos prekėms, kurioms galioja Reglamentai (EEB) Nr. 3033/80 ir (EEB) Nr. 3035/80, įgyvendinimo 1

#### Klaidų ištaisymas

- ★ Klaidų ištaisymas 2008 m. gegužės 30 d. Komisijos reglamento (EB) Nr. 440/2008, nustatančio bandymų metodus pagal Europos Parlamento ir Tarybos reglamentą (EB) Nr. 1907/2006 dėl cheminių medžiagų registracijos, įvertinimo, autorizacijos ir apribojimų (REACH), klaidų ištaisymas <sup>(1)</sup> (OL L 142, 2008 5 31) ..... 3

<sup>(1)</sup> Tekstas svarbus EEE

Kaina: 14 EUR

# LT

Aktai, kurių pavadinimai spausdinami paprastu šriftu, yra susiję su kasdieniu žemės ūkio reikalų valdymu ir paprastai galioja ribotą laikotarpį. Visų kitų aktų pavadinimai spausdinami ryškesniu šriftu ir prieš juos dedama žvaigždutė.



## II

(Įstatymo galios neturintys teisės aktai)

## REGLAMENTAI

## TARYBOS REGLAMENTAS (ES) Nr. 1071/2011

2011 m. spalio 20 d.

**kuriuo panaikinamas Reglamentas (EEB) Nr. 3448/80 dėl 1979 m. Stojimo akto 43 straipsnio dėl prekybos sistemos, taikomos prekėms, kurioms galioja Reglamentai (EEB) Nr. 3033/80 ir (EEB) Nr. 3035/80, įgyvendinimo**

EUROPOS SĄJUNGOS TARYBA,

PRIĖMĖ ŠĮ REGLAMENTĄ:

atsižvelgdama į 1979 m. Stojimo aktą, ypač į jo 43 straipsnį,

1 straipsnis

atsižvelgdama į Europos Komisijos pasiūlymą,

1. Reglamentas (EEB) Nr. 3448/1980 panaikinamas.

kadangi:

2. 1 dalyje nurodyto reglamento panaikinimas nedaro poveikio:

(1) Sąjungos teisės skaidrumo didinimas yra itin svarbus geresnės teisėkūros strategijos, kurią įgyvendina Sąjungos institucijos, elementas. Atsižvelgiant į tai, tikslinga iš galiojančių teisės aktų sąrašo pašalinti tuos aktus, kurie nebeturi realaus poveikio;

a) 1 dalyje nurodyto reglamento pagrindu priimtų Sąjungos aktų tolesniam galiojimui ir

(2) Reglamentu (EEB) Nr. 3448/80 <sup>(1)</sup> nustatytos pereinamojo laikotarpio priemonės, taikomos prekybai į I priedą neįtrauktais produktais tarp EB ir Graikijos nuo 1981 m. lapkričio 1 d. iki 1982 m. liepos 31 d. Kadangi dabar Graikija yra pilnateisė ES narė, tas reglamentas tapo nebeaktualus, taigi jis turėtų būti pašalintas iš galiojančios Sąjungos *acquis*;

b) 1 dalyje nurodytu reglamentu padarytų kitų Sąjungos aktų, kurie nėra panaikinami šiuo reglamentu, pakeitimų tolesniam galiojimui.

2 straipsnis

(3) siekiant teisinio tikrumo ir aiškumo Reglamentas (EEB) Nr. 3448/80 turėtų būti panaikintas,

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

<sup>(1)</sup> OL L 359, 1980 12 31, p. 18.

Šis reglamentas privalomas visas ir tiesiogiai taikomas visose valstybėse narėse.

Priimta Liuksemburge 2011 m. spalio 20 d.

*Tarybos vardu*  
*Pirmininkas*  
M. SAWICKI

---



## KLAIDŲ IŠTAISYMAS

**2008 m. gegužės 30 d. Komisijos reglamento (EB) Nr. 440/2008, nustatančio bandymų metodus pagal Europos Parlamento ir Tarybos reglamentą (EB) Nr. 1907/2006 dėl cheminių medžiagų registracijos, įvertinimo, autorizacijos ir apribojimų (REACH), klaidų ištaisymas**

(Tekstas svarbus EEE)

(Europos Sąjungos oficialusis leidinys L 142, 2008 5 31, p. 1–739)

Visas 2008 m. gegužės 30 d. Komisijos reglamento (EB) Nr. 440/2008, nustatančio bandymų metodus pagal Europos Parlamento ir Tarybos reglamentą (EB) Nr. 1907/2006 dėl cheminių medžiagų registracijos, įvertinimo, autorizacijos ir apribojimų (REACH), tekstas pakeičiamas tokiu tekstu:

### „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<sup>(1)</sup>, 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 ženklinį etiketėmis, suderinimo<sup>(2)</sup> V priede nustatyti cheminių medžiagų bei preparatų fizikinių ir cheminių savybių, toksiškumo ir ekotoksiškumo nustatymo metodai. Direktyvos 67/548/EEB V priedas išbrauktas Europos Parlamento ir Tarybos direktyva 2006/121/EB, kuri bus taikoma nuo 2008 m. birželio 1 d.
- (3) Direktyvos 67/548/EEB V priede nurodytus bandymų metodus reikėtų įtraukti į šį reglamentą.
- (4) Šiuo reglamentu neuždraudžiama taikyti ir kitų bandymų metodų su sąlyga, kad jie būtų taikomi atsižvelgiant į Reglamento 1907/2006 13 straipsnio 3 dalį.

Jis taikomas nuo 2008 m. birželio 1 d.

Priimta Briuselyje 2008 m. gegužės 30 d.

- (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 prirėkus 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*.

Komisijos vardu  
Stavros DIMAS  
Komisijos narys“

<sup>(1)</sup> OL L 396, 2006 12 30, p. 1, pataisyta OL L 136, 2007 5 29, p. 3.

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

## PRIEDAS

## A DALIS. FIZIKINIŲ IR CHEMINIŲ SAVYBIŲ NUSTATYMO METODAI

## TURINYS

A.1.	LYDYMOSI/UŽŠALIMO TEMPERATŪRA .....	5
A.2.	VIRIMO TEMPERATŪRA .....	15
A.3.	SANTYKINIS TANKIS .....	22
A.4.	GARŲ SLĖGIS .....	27
A.5.	PAVIRŠIAUS TEMPTIS .....	51
A.6.	TIRPUMAS VANDENYJE .....	58
A.7.	PASISKIRSTYMO KOEFICIENTAS .....	68
A.8.	PLIŪPSNIO TEMPERATŪRA .....	81
A.9.	DEGUMAS (KIETOSIOS MEDŽIAGOS) .....	83
A.10.	DEGUMAS (DUJOS) .....	86
A.11.	DEGUMAS (SĄLYTIS SU VANDENIU) .....	88
A.12.	KIETŪJŲ IR SKYSTŪJŲ MEDŽIAGŲ PIROFORINĖS SAVYBĖS .....	92
A.13.	SPROGUMAS .....	94
A.14.	SKYSČIŲ IR DUJŲ SAVAIMINIO UŽSILIEPSNOJIMO TEMPERATŪRA .....	105
A.15.	KIETŪJŲ MEDŽIAGŲ SANTYKINĖ SAVAIMINIO UŽSILIEPSNOJIMO TEMPERATŪRA .....	107
A.16.	OKSIDACINĖS SAVYBĖS (KIETOSIOS MEDŽIAGOS) .....	110
A.17.	POLIMERŲ SKAITINĖS VIDUTINĖS MOLEKULINĖS MASĖS IR MOLEKULINĖS MASĖS PASISKIRSTYMAS .....	115
A.18.	MAŽOS MOLEKULINĖS MASĖS MEDŽIAGŲ KIEKIS POLIMERUOSE .....	124
A.19.	POLIMERŲ TIRPUMAS VANDENYJE/EKSTRAHAVIMAS IŠ VANDENS .....	132
A.20.	OKSIDACINĖS SAVYBĖS (SKYSČIAI) .....	136

## A.1. LYDYMOŠI/UŽŠALIMO TEMPERATŪRA

## 1. METODAS

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

## 1.1. ĮVADAS

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

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

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

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

## 1.2. APIBRĖŽTYS IR VIENETAI

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

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

Vienetų pakeitimas (iš K į °C)

$$t = T - 273,15$$

t: temperatūra pagal Celsijų (°C).

T: termodinaminė temperatūra, kelvinai (K).

## 1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

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

Kai kurios kalibravimo medžiagos yra pateiktos nuorodoje (4).

## 1.4. BANDYMO METODO PRINCIPAS

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

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

**1.4.1. Kapiliarinis metodas****1.4.1.1. Lydimosi temperatūros matavimo prietaisai su skysčių vonia**

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

**1.4.1.2. Lydimosi temperatūros matavimo prietaisai su metaliniu bloku**

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

**1.4.1.3. Detekcija fotoelementu**

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

**1.4.2. Karštosios stadijos****1.4.2.1. Koflerio karštasis strypas**

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

**1.4.2.2. 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 objekcinio stiklo yra dedamas bandinys. Metalinės plokštelės centre yra skylė, per kurią patenka šviesa nuo mikroskopo apšvietimo veidrodėlio. Naudojimo metu kamera uždengiama stiklo plokšte, kad į erdvę, kurioje yra bandinys, nepatektų oro.

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

**1.4.2.3. Menisko metodas**

Šis metodas taikomas tiriant poliamidus.

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

**1.4.3. Užšalimo temperatūros nustatymo metodas**

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

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

1.4.4. **Terminė analizė**1.4.4.1. *Diferencinė ir terminė analizė (DTA)*

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

1.4.4.2. *Diferencinė skenuojamoji kalorimetrija (DSK)*

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

1.4.5. **Takumo temperatūra**

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

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

1.5. **KOKYBĖS KRITERIJAI**

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

LENTELĖ. METODŲ TINKAMUMAS

A. **Kapiliariniai metodai**

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

(1) Priklauso nuo prietaiso rūšies ir medžiagos grynumo.

**B. Karštosios stadijos ir užšalimo metodai**

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

<sup>(1)</sup> Priklauso nuo prietaiso rūšies ir medžiagos grynumo.

**C. Terminė analizė**

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

<sup>(1)</sup> Priklauso nuo prietaiso rūšies ir medžiagos grynumo.

**D. Takumo temperatūra**

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

<sup>(1)</sup> Priklauso nuo prietaiso rūšies ir medžiagos grynumo.

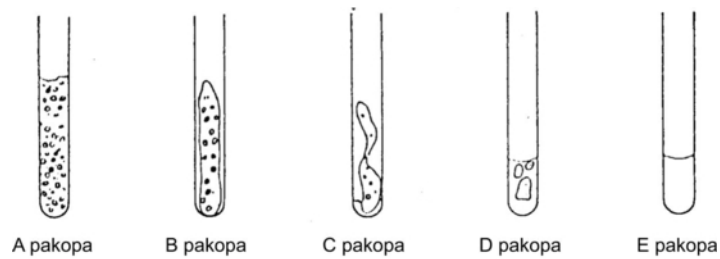
**1.6. METODŲ APIBŪDINIMAS**

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

**1.6.1. Kapiliariniai metodai**

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

## 1 paveikslas



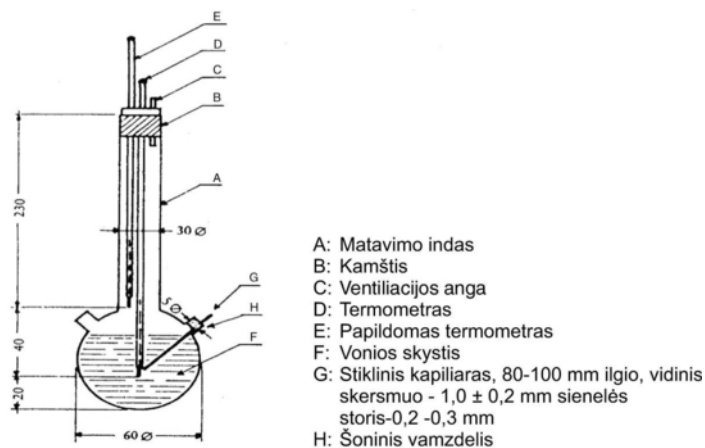
- A pakopa (lydymosi pradžia): smulkūs lašeliai vienodai prilimpa prie vidinės kapiliarinio vamzdelio sienelės
- B pakopa tarp mėginio ir vidinės sienelės atsiranda tarpas dėl lydinio suslūgimo.
- C pakopa suslūgęs mėginys pradeda smukti žemyn ir skystėti.
- D pakopa paviršiuje susidaro meniskas, bet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

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

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

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

## 2 paveikslas



## Vonios skystis

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

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

#### *Termometras*

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

ASTM E 1–71, DIN 12770, JIS K 8001.

#### *Darbo eiga*

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

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

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

#### *Apskaičiavimas*

Lydymosi temperatūra apskaičiuojama taip:

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

čia:

T = koreguota lydymosi temperatūra, K

T<sub>D</sub> = D termometro rodmenys, K

T<sub>E</sub> = E termometro rodmenys, K

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

#### 1.6.1.2. *Lydymosi temperatūros nustatymo prietaisai su metaliniu bloku*

##### *Aparatūra*

##### *Ją sudaro:*

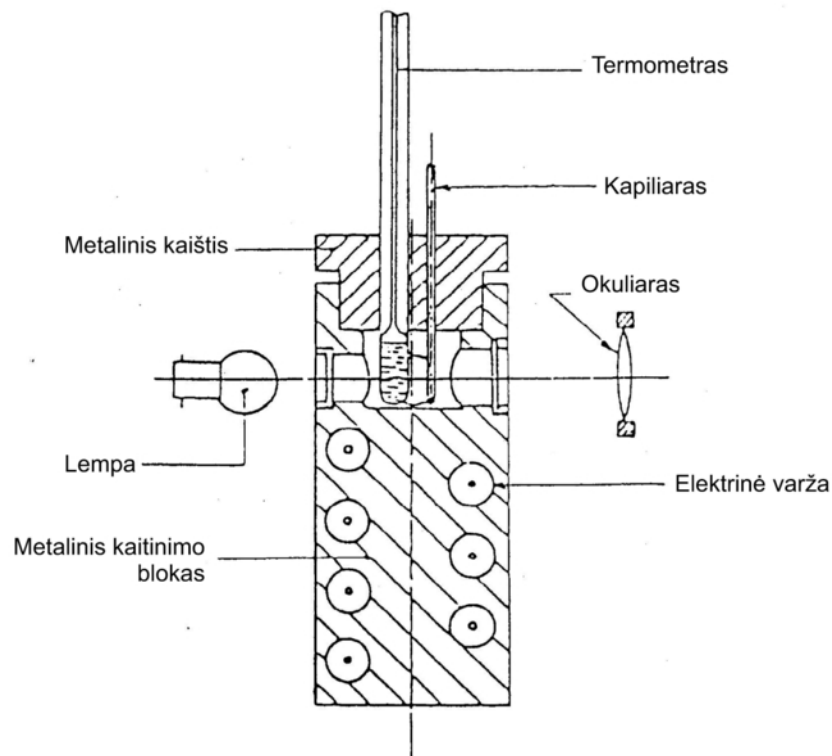
- cilindrinis metalinis blokas, kurio viršutinė dalis yra tuščia ir sudaro ertmę (žr. 3 pav.),
- metalinis kaištis su dviem ar keliomis skylutėmis, per kurias kapiliaras įstatomas į metalinį bloką,
- metalinio bloko kaitinimo sistema, kuri, pavyzdžiui, yra tiekama per bloke įtaisytą elektrinę varžą,
- 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, viename gale užlydytas (žr. 1.6.1.1).



## Termometras

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

3 paveikslas



## 1.6.1.3. Detekcija fotoelementu

## Aparatūra ir darbo eiga

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

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

## 1.6.2. Karštosios stadijos

## 1.6.2.1. Koflerio karštasis strypas

Žr. priedėlį.

## 1.6.2.2. Lydymosi temperatūros mikroskopas

Žr. priedėlį.

## 1.6.2.3. Menisko metodas (poliamidai)

Žr. priedėlį.

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

## 1.6.3. Užšalimo temperatūros nustatymo metodai

Žr. priedėlį.

**1.6.4. Terminė analizė**1.6.4.1. *Diferencinė terminė analizė*

Žr. priedėlį.

1.6.4.2. *Diferencinė skenuojamoji kalorimetrija*

Žr. priedėlį.

**1.6.5. Takumo temperatūros nustatymas**

Žr. priedėlį.

**2. DUOMENYS**

Kai kuriais atvejais reikalinga termometro korekcija.

**3. ATASKAITOS PATEIKIMAS**

Bandymo ataskaitoje, jeigu įmanoma, pateikiama tokia informacija:

- naudotas metodas,
- tikslus medžiagos apibūdinimas (tapatumas ir priemaišos) ir preliminarios gryninimo, jeigu toks naudojamas, stadijos,
- tikslumo apskaičiavimas.

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

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

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

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

**4. NUORODOS**

- 1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 103, Decision of the Council C (81) 30 (final).
- 2) IUPAC, B. Le Neindre, B. Vodar, eds. Experimental thermodynamics, Butterworths, London 1975, vol. II, p. 803–834.
- 3) R. Weissberger ed.: Technique of organic Chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed., Interscience Publ., New York, 1959, vol. I, Part I, Chapter VII.
- 4) IUPAC, Physicochemical measurements: Catalogue of reference materials from national laboratories, Pure and applied chemistry, 1976, vol. 48, p. 505–515.

*Priedėlis**Papildomos techninės informacijos, pavyzdžiui, galima ieškoti toliau nurodytuose standartuose***1. Kapiliariniai metodai**

## 1.1. Lydymosi temperatūros nustatymo prietaisai su skysčių vonia

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

## 1.2. Lydymosi temperatūros nustatymo prietaisai su metaliniu bloku

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

**2. Karštosios stadijos**

## 2.1. Koflerio karštasis strypas

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

## 2.2. Lydymosi temperatūros mikroskopas

DIN 53736	Dalinių kristalinių plastmasių lydymosi temperatūros vizualinis nustatymas.
-----------	---

## 2.3. Menisko metodas (poliamidai)

ISO 1218 (E)	Plastmasės – poliamidai – „lydymosi taško“ nustatymas.
ANSI/ASTM D 2133–66	Standartinė specifikacija acetilintai dervai iš medžiagų formuoti ir štampuoti.
NF T 51–050	Poliamidų lydymosi taško nustatymas menisko metodu.

**3. Užšalimo temperatūros nustatymo metodai**

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

**4. Terminė analizė**

## 4.1. Diferencinė terminė analizė

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

## 4.2. Diferencinė skenuojamoji kalorimetrija

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

**5. Takumo temperatūros nustatymas**

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

## A.2. VIRIMO TEMPERATŪRA

## 1. METODAS

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

## 1.1. ĮVADAS

Čia apibūdinti metodai ir prietaisai gali būti naudojami skystoms ir lengvai besilydančioms medžiagoms, jei cheminių reakcijų, kuriose jos dalyvauja, temperatūra nėra žemesnė nei virimo temperatūra (pvz., autooksidacija, persigrūpavimas, skilimas ir pan.). Šių metodą 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 pobūdžio. Jeigu mėginyje yra lakiųjų priemaišų, kurios galėtų turėti įtakos rezultatams, medžiagą reikia išgryninti.

## 1.2. APIBRĖŽTYS IR VIENETAI

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

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

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

čia:

$p$  = medžiagos garų slėgis paskaliais

$\Delta H_v$  = garavimo šiluma, J mol<sup>-1</sup>

$R$  = universalioji molinė dujų konstanta = 8,314 J mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup>

$T$  = termodinaminė temperatūra, K

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

*Vienetų perskaičiavimas*

Slėgis (vienetai: kPa)

100 kPa = 1 baras = 0,1 MPa  
(„baras“ vis dar leistinas, bet nerekomenduojamas)

133 Pa = 1 mm Hg = 1 Torr  
(neleistini vienetai „mm Hg“ ir „Torr“)

1 atm = standartinė atmosfera = 101 325 Pa  
(neleistinas vienetas „atm“)

Temperatūra (vienetai: K)

$$t = T - 273,15$$

t : Celsijaus temperatūra, Celsijaus laipsniai (°C)

T : termodinaminė temperatūra, kelvinai (K)

### 1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

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

Kai kurias kalibravimo medžiagas galima rasti priede išvardytuose metoduose.

### 1.4. BANDYMO METODO PRINCIPAS

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

#### 1.4.1. Nustatymas ebulioskopu

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

#### 1.4.2. Dinaminis metodas

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

#### 1.4.3. Distiliacijos metodas virimo temperatūrai nustatyti

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

#### 1.4.4. „Siwoloffo“ metodas

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

#### 1.4.5. Detekcija fotoelementu

Pagal Siwoloffo 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 temperatūrų programa. Jeigu bandinyje įvyksta virsmas, kurio metu pasikeičia entalpija, tą pokytį parodo endoterminis nuokrypis (virimas) nuo pagrindinės užrašytų temperatūrų linijos.

#### 1.4.7. Diferencinė skenuojamoji kalorimetrija

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

## 1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

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

1 lentelė

**Metodų palyginimas**

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

<sup>(1)</sup> Šis tikslumas tinka tik labai paprastai priemonei, pavyzdžiui, aprašyti ASTM D 1120-72; ji gali būti patobulinta sudėtingesniais ebulioskopiniais prietaisais.

<sup>(2)</sup> Tinka tik grynomis medžiagoms. Naudojant kitokiomis sąlygomis, reikėtų pagrįsti.

## 1.6. METODŲ APIBŪDINIMAS

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

1.6.1. **Ebulioskopas**

Žr. priedėlį

1.6.2. **Dinaminis metodas**

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

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

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

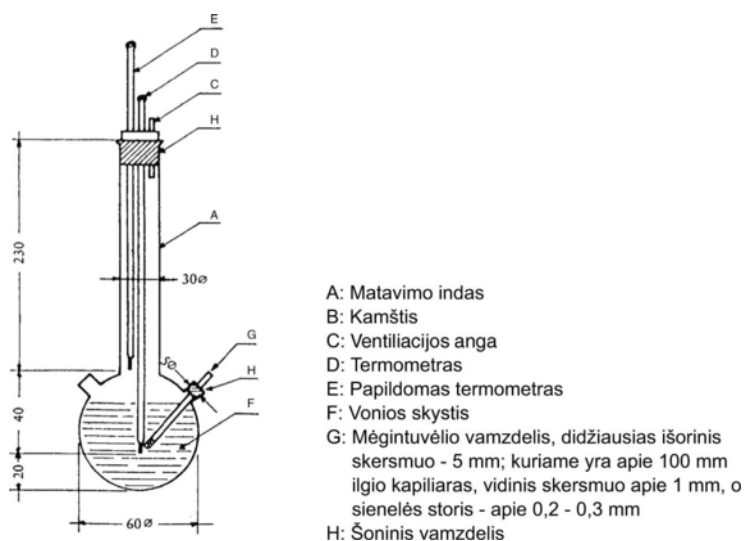
Žr. priedėlį.

1.6.4. **Siwoloboff'o metodas**

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

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

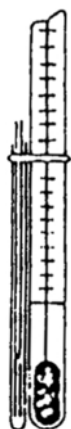
1 paveikslas



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

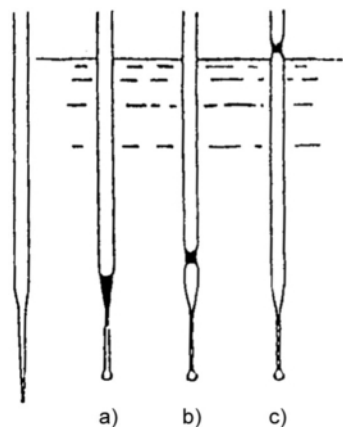
2 pav.

Pagal Siwoloboffą



3 pav.

Modifikuotas variantas



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

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

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



1.6.5. **Detekcija fotoelementu**

Kapiliariniame vamzdelyje esantis bandinys šildomas įkaitintame metaliniame bloke.

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

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

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

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 nedideliams nukrypimams nuo normalaus slėgio (daugiausiai  $\pm 5$  kPa), virimo temperatūra normalizuojama iki  $T_n$  naudojantis tokiais Sidney Young skaitmeninių verčių lygtimis:

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

čia:

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

$$P = \text{slėgio matavimas, kPa}$$

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

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

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

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

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

2 lentelė

**Temperatūra. Korekcijos koeficientai  $f_T$**

Temperatūra T (K)	Korekcijos koeficientas $f_T$ (K/kPa)
323,15	0,26
348,15	0,28
373,15	0,31
398,15	0,33
423,15	0,35
448,15	0,37

Temperatūra T (K)	Korekcijos koeficientas $f_T$ (K/kPa)
473,15	0,39
498,15	0,41
523,15	0,44
548,15	0,45
573,15	0,47

### 3. ATASKAITOS PATEIKIMAS

Į bandymo ataskaitą, jeigu įmanoma, įtraukiama tokia informacija:

- naudotas metodas,
- tikslus medžiagos apibūdinimas (tapatumas ir priemonės) ir preliminarios gryninimo, jeigu toks naudojamas, stadijos,
- tikslumo apskaičiavimas.

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

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

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

### 4. NUORODOS

- 1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 103, Decision of the Council C (81) 30 final.
- 2) IUPAC, B. Le Neindre, B. Vodar, editions. Experimental thermodynamics, Butterworths, London 1975, volume II.
- 3) R. Weissberger edition: Technique of organic chemistry, Physical methods of organic chemistry, Third Edition, Interscience Publications, New York, 1959, volume I, Part I, Chapter VIII.

Priedėlis

*Papildomos techninės informacijos, pavyzdžiui, galima ieškoti toliau nurodytuose standartuose*

1. **Ebulioskopas**

1.1. Lydimosi temperatūros nustatymo prietaisai su skysčių vonia

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

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

ISO/R 918 Distiliacijos tyrimo metodas. Distiliacijos eiga ir diapozonas.

BS 4349/68 Distiliacijos naftos produktuose nustatymo metodas.

BS 4591/71 Distiliacijos charakteristikų nustatymo metodas.

DIN 53171 Pagrindiniai rodikliai. Virimo nustatymas.

NF T 20–608 Distiliacija: distiliacijos intervalo nustatymas.

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

ASTM E 537–76 Standartinis metodas chemikalų įvertinimo metodas diferencijuotos šiluminės analizės metodais.

ASTM E 473–85 Standartinis šiluminės analizės nustatymas.

ASTM E 472–86 Šiluminės analizės duomenų panaudojimo standartas.

DIN 51005 Šiluminė analizė: sąvokos.

## A.3. SANTYKINIS TANKIS

## 1. METODAS

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

## 1.1. ĮVADAS

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

## 1.2. APIBRĖŽTYS IR VIENETAI

Skystųjų ir kietųjų medžiagų santykinis tankis  $D_4^{20}$  yra tam tikro tiriamosios medžiagos tūrio masės, esant 20 °C, ir tokio paties tūrio vandens masės, esant 4 °C temperatūrai, santykis. Santykinis tankis yra bedimensis dydis.

Medžiagos tankis  $\rho$  yra jos masės  $m$  ir tūrio  $v$  dalmuo.

Tankis,  $\rho$ , SI vienetais nurodomas –  $\text{kg/m}^3$ .

## 1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS (1) (3)

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

## 1.4. METODO PRINCIPAS

Naudojamos keturios bandymų metodų klasės.

## 1.4.1. Plūdrumo metodai

## 1.4.1.1. Hidrometras (skystosioms medžiagoms)

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

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

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

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

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

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

## 1.4.2. Píknometrijos metodai

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

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

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

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

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

1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

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

1.6. METODO APIBŪDINIMAS

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

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

2. **DUOMENYS**

Žr. standartus.

3. **ATASKAITOS PATEIKIMAS**

Ataskaitoje apie tyrimą, jeigu įmanoma, pateikiama tokia informacija:

- naudotas metodas,
- tikslus medžiagos apibūdinimas (tapatumas ir priemonės) bei preliminarios gryninimo, jeigu toks naudojamas, stadijos.

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

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

Lentelė

**Metodų tinkamumas**

Matavimo metodas	Tankis		Didžiausia galima dinaminė klampa	Galiojantys standartai
	Kietieji kūnai	Skysčiai		
1.4.1.1. Hidrometras		Taip	5 Pa s	ISO 387 ISO 649-2 NF T 20-050

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

#### 4. NUORODOS

- 1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 109, Decision of the Council C(81) 30 final.
- 2) R. Weissberger ed., Technique of Organic Chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed., Chapter IV, Interscience Publ., New York, 1959, vol. I, Part 1.
- 3) IUPAC, Recommended reference materials for realization of physico-chemical properties, Pure and applied chemistry, 1976, vol. 48, p. 508.
- 4) Wagenbreth, H., Die Tauchkugel zur Bestimmung der Dichte von Flüssigkeiten, Technisches Messen tm, 1979, vol.11, 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.

## Priedėlis

Papildomos techninės informacijos, pavyzdžiui, galima ieškoti toliau nurodytuose standartuose

1. **Plūdrumo metodai**

## 1.1. Hidrometras

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

## 1.2. Hidrostatinis balansas

*Kietosioms medžiagoms*

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

*Skystosioms medžiagoms*

ISO 901	ISO 758
DIN 51757	Mineralinių alyvų ir susijusių medžiagų tyrimas; tankio nustatymas
ASTM D 941-55, ASTM D 1296-67 ir ASTM D 1481-62	
ASTM D 1298	Žalios naftos ir skystųjų naftos produktų tankio, specifinio ar API tankio nustatymas hidrometrijos metodu.
BS 4714	Žalios naftos ir skystųjų naftos produktų tankio, specifinio ar API tankio nustatymas hidrometrijos metodu.

## 1.3. Panardintų kūnų metodas

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

2. **Piknometrijos metodai**

## 2.1. Skystosioms medžiagoms

ISO 3507	Piknometrai
ISO 758	Skystieji cheminiai produktai; tankio nustatymas 20 °C temperatūroje
DIN 12797	Gay-Lussac piknometras (nelakiems ir mažai klampiams skysčiams skysčiams.)

DIN 12798	<i>Lipkin</i> piknometras (skysčiams, kurių kinematinė klampa mažesnė kaip $100 \times 10^{-6} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ 15 °C temperatūroje)
DIN 12800	<i>Sprengel</i> piknometras (skysčiams pagal DIN 12798)
DIN 12801	<i>Reischauer</i> 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)
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, pagal DIN 12801)
DIN 12808	<i>Jaulmes</i> piknometras (ypač etanolio - vandens mišiniams)
DIN 12809	Piknometras su pagrindiniu termometru ir kapiliariniu vamzdeliu (skysčiams, kurie nėra per klampūs)
DIN 53217	Dažų, lakų ir panašių produktų tyrimas; tankio nustatymas piknometru
DIN 51757	7 punktas. Mineralinių alyvų ir susijusių medžiagų tyrimas; tankio nustatymas
ASTM D 297	15 skirsnis. Gumos produktai – cheminė analizė
ASTM D 2111	C metodas. Halogeninti organiniai junginiai
BS 4699	Naftos produktų specifinio sunkio ir tankio nustatymo metodas (graduoto dviejų kapiliarų piknometro metodas).
BS 5903	Naftos produktų santykinio tankio ir tankio nustatymo metodas kapiliariniu – užkimštu piknometru
NF T 20–053	Cheminiai produktai pramoniniam naudojimui. Milteliuose ir skysčiuose esančių kietųjų dalelių tankio nustatymas. Piknometrijos metodas.

## 2.2. Kietosioms medžiagoms

ISO 1183	B metodas. Plastikų, išskyrus aktyviųjų, tankio ir santykinio tankio nustatymo metodai
NF T 20–053	Cheminiai produktai pramoniniam naudojimui. Milteliuose ir skysčiuose esančių kietųjų dalelių tankio nustatymas. Piknometrijos metodas
DIN 19683	Dirvožemių tankio nustatymas

## 3. Oro palyginamasis piknometras

DIN 55990	3 dalis: Dažų ir kitų dangų tyrimas. Lako milteliai. Tankio nustatymas.
DIN 53243	Dažančios medžiagos. Chlorinti polimerai. Nustatymas.



## A.4. GARŲ SLĖGIS

## 1. METODAS

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

## 1.1. ĮVADAS

Atliekant šį bandymą naudinga turėti išankstinės informacijos apie medžiagos struktūrą, lydymosi temperatūrą ir virimo temperatūrą.

Nėra vienintelio matavimų būdo, taikytino visam garų slėgių intervalui. Todėl garų slėgiui nuo  $< 10^{-4}$  iki  $10^5$  Pa matuoti rekomenduojama naudoti kelis metodus.

Paprastai priemaišos turi įtakos garų slėgiui ir tai visų pirma priklauso nuo priemaišų rūšies.

Jeigu bandinyje yra lakių priemaišų, kurios galėtų turėti įtakos rezultatams, medžiaga gali būti gryninama. Taip pat tiktų nustatyti garų slėgį techninėms medžiagoms.

Kai kuriuose čia apibūdintuose metoduose naudojamas aparatas su metalinėmis dalimis; jį tai turėtų būti atsižvelgiama tiriant esdinančias (ardančias) medžiagas.

## 1.2. APIBRĖŽTYS IR VIENETAI

Medžiagos garų slėgis yra apibrėžiamas kaip sočiųjų garų slėgis virš kietosios arba skystosios medžiagos. Esant termodinaminei pusiausvyrai grynos medžiagos garų slėgis – tai tik temperatūros funkcija.

Naudotinas SI slėgio vienetas turėtų būti paskalis (Pa).

Vienetai, kurie buvo istoriškai naudojami, kartu su konversijos koeficientais:

$$1 \text{ toras (1 mmHg)} = 1,333 \times 10^2 \text{ Pa}$$

$$1 \text{ atmosfera} = 1,013 \times 10^5 \text{ Pa}$$

$$1 \text{ baras} = 10^5 \text{ Pa}$$

Temperatūros vienetas SI sistemoje – kelvinas (K).

Universioji molinė dujų konstanta  $R = 8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ .

Dujų slėgio temperatūrinė priklausomybė yra apibūdinta Klauzijaus-Klapeirono lygtimi:

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

čia:

$p$  = medžiagos garų slėgis paskaliais

$\Delta H_v$  = garinimo šiluma,  $\text{J mol}^{-1}$

$R$  = universioji molinė dujų konstanta,  $\text{J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$

$T$  = termodinaminė temperatūra, K

### 1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Nebūtina naudoti etaloninių medžiagų visais tais atvejais, kai tiriama nauja medžiaga. Pirmiausia jos turėtų būti naudojamos kartkartėmis tikrinant šio metodo veikimą ir gautiems rezultatams palyginti su kitų metodų rezultatais.

### 1.4. TYRIMO METODŲ PRINCIPAS

Garų slėgiui nustatyti yra siūlomi septyni metodai, kuriuos galima taikyti skirtingiems garų slėgio intervalams. Kiekvienu metodu garų slėgis yra nustatomas įvairiose temperatūrose. Kai temperatūrų intervalas ribotas, grynos medžiagos garų slėgio logaritmas yra temperatūros inversijos tiesinė funkcija.

#### 1.4.1. **Dinaminis metodas**

Dinaminiu metodu yra matuojama virimo temperatūra, kuri priklauso nuo apibrėžto slėgio.

Rekomenduojamas intervalas:

$10^3$ – $10^5$  Pa.

Šis metodas taip pat rekomenduojamas nustatant normalią virimo temperatūrą ir yra patogus, kai temperatūra yra iki 600 K.

#### 1.4.2. **Statinis metodas**

Statinuose procesuose, esant termodinaminei pusiausvyrai, uždaroje sistemoje susidaręs garų slėgis yra nustatomas apibrėžtoje temperatūroje. Šis metodas tinka vienkomponentėms ir daugiakomponentėms kietosioms ir skystosioms medžiagoms.

Rekomenduojamas intervalas:

$10$ – $10^5$  Pa.

Šis metodas taip pat gali būti naudojamas  $1$ – $10$  Pa intervale, jeigu atsargiai elgiamasi.

#### 1.4.3. **Izoteniskopas**

Šis standartizuotas metodas taip pat yra statinis metodas, bet paprastai netinka daugiakomponentėms sistemoms. Papildomos informacijos galima gauti: ASTM metodas D-2879–86.

Rekomenduojamas intervalas:

nuo  $100$  iki  $10^5$  Pa.

#### 1.4.4. **Efuzijos metodas: garų slėgio pusiausvyra**

Medžiagos kiekis, išeinantis iš elemento per laiko vienetą per žinomo dydžio angą yra nustatomas vakuume taip, kad medžiagos sugrįžimas į kamerą būtų nereikšmingas (pvz., matuojant impulsą, generuotą jautrioje pusiausvyroje garų čiurkšle arba matuojant prarastą svorį).

Rekomenduojamas intervalas:

$10^{-3}$ – $1$  Pa.

#### 1.4.5. **Efuzijos metodas: masės praradimas arba išgaravusių medžiagų surinkimas**

Metodas pagrįstas tiriamos medžiagos, garų pavidalu išlekiančios iš Knudsen'o kameros (4) per laiko vienetą per angą ultravakuumo sąlygomis, masės apskaičiavimu. Pasišalinusių garų masę galima gauti nustatant kameros sumažėjusių masę arba kondensuojant garus žemoje temperatūroje ir nustatant išgarintos medžiagos kiekį chromatografinės analizės būdu. Garų slėgis apskaičiuojamas naudojant Hertz-Knudsen'o priklausomybę.

Rekomenduojamas intervalas:

$10^{-3}$ –1 Pa.

#### 1.4.6. Dujų soties metodas

Inertinių nešančiųjų dujų srovė leidžiama virš medžiagos taip, kad ji išsotina jų garais. Medžiagos, perneštos žinomą nešančiųjų dujų kiekiu, kiekis yra matuojamas arba surenkant į tinkamą gaudyklę, arba betarpiška analize technika. Tai naudojama garų slėgiui apskaičiuoti esant tam tikrai temperatūrai.

Rekomenduojamas intervalas:

$10^{-4}$ –1 Pa.

Šį metodą taip pat galima naudoti 1–10 Pa intervale, jeigu atsargiai elgiamasi.

#### 1.4.7. Sukamasis rotorius

Sukamojo rotoriaus manometre tikrasis matavimo elementas – plieno rutuliukas, kybant magnetiniame lauke ir besisukantis labai dideliu greičiu. Dujų slėgis yra nustatomas pagal nuo slėgio priklausantį plieno rutuliuko lėtėjimą.

Rekomenduojamas intervalas:

$10^{-4}$ –0,5 Pa.

### 1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

Įvairūs garų slėgio nustatymo metodai yra palyginami pagal jų taikytinumą, pasikartojamumą, atkuriamumą, matavimo intervalą, galiojantį standartą. Tai padaryta šioje lentelėje.

Matavimo metodas	Medžiagos		Apskaičiuojamas pasikartojamumas <sup>(1)</sup>	Apskaičiuotas atkuriamumas <sup>(1)</sup>	Rekomenduojamas intervalas	Galiojantis standartas
	kietosios	skystosios				
1.4.1. Dinaminis metodas	Mažai tirpios	Taip	Iki 25 %	Iki 25 %	Nuo $10^3$ Pa iki $2 \times 10^3$ Pa	—
			1–5 %	1–5 %	Nuo $2 \times 10^3$ Pa iki $10^5$ Pa	—
1.4.2. Statinis metodas	Taip	Taip	5–10 %	5–10 %	10 Pa – $10^5$ Pa <sup>(2)</sup>	NFT 20–048 (5)
1.4.3. Izoteniskopas	Taip	Taip	5–10 %	5–10 %	$10^2$ Pa – $10^5$ Pa	ASTM-D 2879–86
1.4.4. Efuzijos metodas – garų slėgio pusiausvyra	Taip	Taip	5–20 %	Iki 50 %	$10^{-3}$ Pa – 1 Pa	NFT 20–047(6)

Matavimo metodas	Medžiagos		Apskaičiuojamas pasikartojamumas <sup>(1)</sup>	Apskaičiuotas atkuriamumas <sup>(1)</sup>	Rekomenduojamas intervalas	Galiojantis standartas
	kietosios	skystosios				
1.4.5. Efuzijos metodas – masės pradimas	Taip	Taip	10–30 %	—	10 <sup>-3</sup> Pa – 1 Pa	—
1.4.6. Dujų sotes metodas	Taip	Taip	10–30 %	Iki 50 %	10 <sup>-4</sup> Pa – 1 Pa <sup>(2)</sup>	—
1.4.7. Sukamojo rotoriaus metodas	Taip	Taip	10–20 %	—	10 <sup>-4</sup> Pa – 0,5 Pa	—

<sup>(1)</sup> Priklauso nuo grynumo laipsnio

<sup>(2)</sup> Šiuos metodus taip pat galima naudoti 1–10 Pa intervale, jeigu atsargiai elgiamasi.

## 1.6. METODŲ APIBŪDINIMAS

### 1.6.1. Dinaminis matavimas

#### 1.6.1.1. Aparatūra

Paprastai matavimo aparatūrą sudaro virinimo indas su stikliniu arba metaliniu aušintuvu (1 pav.), temperatūros matavimo įrenginys, slėgio reguliavimo ir matavimo įrenginys. Paveiksle parodytas paprastas matavimo aparatas yra padarytas iš karščiui atsparaus stiklo ir sudarytas iš penkių dalių:

didelį, iš dalies dvigubų sienelių vamzdį sudaro matinio gaubto jungtis, aušintuvas, aušinimo indas ir įsiurbimo anga.

Stiklo cilindras su *Cottrell'o* „siurbliu“ yra įtaisomas vamzdyje virinimo dalyje, o smulkinto stiklo paviršius yra nelygus, kad būtų išvengiama „kunkuliavimo“ virinimo metu.

Temperatūra matuojama atitinkamu temperatūros jutikliu (pvz., varžiniu termometru, gaubto termoelementu), panardintu aparate iki matavimo padalos (1 pav., Nr. 5) per atitinkamą įsiurbimo angą (pvz., vidinį įvadą).

Reikalingos jungtys yra padarytos taip, kad būtų galima reguliuoti slėgį ir tiktų matavimo įrenginiui.

Kolba, kuri veikia kaip buferinis tūris, su matavimo aparatu yra sujungta kapiliariniu vamzdeliu.

Virinimo indas kaitinamas kaitinimo elementu, iš apačios įdėtu į stiklinį aparatą. Kaitinimui reikalinga srovė nustatoma ir reguliuojama termoelementu.

Vakuuminis siurbliu sudaromas būtinas vakuumas tarp 10<sup>2</sup> Pa ir apytikriai 10<sup>5</sup> Pa.

Slėgiui reguliuoti naudojamas atitinkamas oro arba azoto matavimo (matavimo intervalas apytikriai 10<sup>-1</sup>–10<sup>5</sup> Pa) ir vėdinimo vožtuvas.

Slėgis matuojamas manometru.

#### 1.6.1.2. Matavimo eiga

Garų slėgis matuojamas nustatant bandinio temperatūrą įvairiuose apibrėžtuose slėgiuose, apie 10<sup>3</sup>–10<sup>5</sup> Pa. Nekintanti temperatūra esant pastoviam slėgiui rodo, kad pasiekta virimo temperatūra. Šio metodo negalima naudoti putokšliams matuoti.

Medžiaga dedama į švarų sausą indą. Gali būti sunkumų naudojant nemiltelinius kietuosius kūnus, bet jų kartais nelieka pašildant aušinimo gaubtą. Kai tik indas užpildomas, aparato jungė užsandarinama, o medžiaga degazuojama. Tada nustatomas žemiausias norimas slėgis ir įjungiamas kaitinimas. Tuo pačiu metu temperatūros jutiklis sujungiamas su savirašiu.

Pusiausvyra pasiekama, kai esant pastoviam slėgiui užregistruojama pastovi temperatūra. Reikia būti ypač atsargiems ir virinimo metu vengti kunkuliavimo. Be to, ant aušintuvo turi įvykti visiška kondensacija. Nustatant lengvai besilydančių kietųjų medžiagų garų slėgi, reikia stebėti, kad neužsikimštų kondensatorius.

Užregistravus pusiausvyros tašką, nustatomas didesnis slėgis. Šis procesas kartojamas, kol pasiekama  $10^5$  Pa (iš viso apie 5–10 matavimo taškų). Siekiant patikrinti, pusiausvyros taškai turi būti kartojami mažesniuose slėgiuose.

## 1.6.2. Statinis matavimas

### 1.6.2.1. Aparatūra

Aparatą sudaro bandinio kamera, kaitinimo ir aušinimo sistema bandinio temperatūrai reguliuoti ir temperatūrai matuoti. Į aparato sudėtį taip pat įeina prietaisai slėgiui nustatyti (reguluoti) ir matuoti. 2a ir 2b paveiksluose parodyti pagrindiniai principai.

Prie bandymo kameros (2a pav.) iš vienos pusės yra pritvirtinamas atitinkamas didelio slėgio vožtuvas. U formos vamzdelis, kuriame yra atitinkamas manometro skystis, yra pritvirtinamas iš kitos pusės. Vienas U formos vamzdelio galas atsišakoja į vakuuminį siurbį, azoto cilindrą arba ventiliacijos vožtuvą ir manometrą.

Vietoje U formos vamzdelio gali būti naudojamas manometras su slėgio indikatoriumi (2b pav.).

Bandinio temperatūrai reguliuoti, bandinio kamera su vožtuvu ir U formos vamzdeliu arba manometru patalpinama į vonią, kurioje palaikoma pastovi  $\pm 0,2$  K temperatūra. Temperatūra matuojama išorinėje indo, kuriame yra bandinys, sienelės pusėje arba pačiame inde.

Vakuuminis siurblys su prieš srovę veikiančiu aušinimo sifonu naudojamas sudaryti vakuumą aparate.

2a metodu medžiagos garų slėgis yra matuojamas netiesiogiai naudojant nulinį indikatorių. Tokiu būdu atsižvelgiama į tai, kad U formos vamzdelyje esančio skysčio tankis pasikeičia, jeigu temperatūra smarkiai keičiasi.

Nuliniais indikatoriais U formos vamzdelyje priklausomai nuo slėgio intervalo ir bandinio cheminių savybių gali būti naudojami silikoninės alyvos, ftalatai. Tiriamoji medžiaga neturi labai smarkiai ištirpti arba reaguoti su U formos vamzdelyje esančiu skysčiu.

Manometre gali būti naudojamas gyvsidabris, esant įprastam slėgiui iki  $10^2$  Pa, o silikoninės alyvos bei ftalatai tinka naudoti, kai slėgis yra žemesnis nei  $10^2$  Pa, bet ne žemesnis nei 10 Pa. Šildomos membranos manometrai gali būti naudojami net tada, kai slėgis žemesnis kaip  $10^{-1}$  Pa. Taip pat yra ir kitokių slėgio matuoklių, kurie gali būti naudojami esant mažesniai kaip  $10^2$  Pa slėgiui.

### 1.6.2.2. Matavimų eiga

Prieš matuojant visos 2 pvz., pavaizduoto prietaiso dalys turi būti kruopščiai išvalytos ir išdžiovintos.

Pagal 2a metodą U formos vamzdelis užpildomas pasirinktu skysčiu, kuris prieš užrašant parodymus gali būti degazuotas aukštesnėje temperatūroje.

Tiriamoji medžiaga dedama į aparatą, kuris po to uždaromas, o temperatūra sumažinama tiek, kad būtų galima atlikti degazavimą. Temperatūra turi būti pakankamai žema, kad būtų užtikrintas oro išsiurbimas, bet daugia-komponenčių sistemų atveju tai neturi pakeisti medžiagos struktūros. Jeigu reikia, maišant galima greičiau nustatyti pusiausvyrą.

Bandinį galima peršaldyti, pvz., skystu azotu (stengiantis, kad neįvyktų oro arba siurblyje esančio skysčio kondensacija) arba etanolio ir sauso ledo mišiniu. Žemai temperatūrai matuoti naudojama reguliuojamos temperatūros vonia, sujungta su ypač žemos temperatūros matuokliu.

Atidarius bandymo kameros vožtuvą, siurbiami kelias minutes, kad būtų pašalintas oras. Po to vožtuvas uždaromas, o bandinio temperatūra sumažinama iki žemiausio norimo lygio. Reikalui esant, degazavimo veiksmas turi būti pakartojami kelis kartus.

Bandinį kaitinant garų slėgis kyla. Tai pakeičia U formos vamzdyje esančio skysčio pusiausvyrą. Jai atstatyti į aparatą per vožtuvą leidžiama azoto arba oro, kol slėgio indikatorius skystis vėl bus ties nuline padala. Tam reikalingą slėgį gali kambario temperatūroje parodyti precizinis manometras. Šis slėgis atitinka medžiagos garų slėgį tam tikroje matuojamoje temperatūroje.

2b metodas yra panašus, bet garų slėgio parodymai nuskaitomi tiesiogiai.

Garų slėgio priklausomybė nuo temperatūros yra nustatoma gana mažais intervalais (iš viso apytikriai 5–10 matavimo taškų) iki norimo maksimumo. Žemos temperatūros parodymai turi būti pakartotinai išmatuoti kaip kontrolė.

Jeigu iš pakartotinių matavimų gautos vertės nesutampa su esančiomis kreivėje, gautoje padidinus temperatūrą, tai gali būti dėl vienos iš šių priežasčių:

1. Bandinyje tebėra oro (pvz., didelio klampumo medžiagose) arba liko medžiagų, kurių virimo temperatūra yra žema ir kuri/kurios išsiskiria kaitinimo metu. Jos gali būti pašalinamos išsiurbiant po papildomo persaldymo.
2. Aušinimo temperatūra yra nepakankamai žema. Šiuo atveju aušinimui naudojamas skystasis azotas.

Tiek 1, tiek 2 atveju matavimai turi būti pakartojami.

3. Medžiaga chemiškai aktyvi tiriamajame temperatūros intervale (pvz., skilimas, polimerizacija).

### 1.6.3. Izoteniskopas

Išsamų šio metodo aprašymą galima rasti 7 nuorodoje. Šio matavimo prietaiso principas pavaizduotas 3 paveiksle. Panašiai kaip statinis metodas, apibūdintas 1.6.2, izoteniskopas tinka tyrinėti kietuosius ir skystuosius kūnus.

Jeigu tai skystieji kūnai, pati medžiaga naudojama kaip skystis pagalbiniam manometre. Į izoteniskopą įpilamas toks kiekis skysčio, kurio pakanka kolbai užpildyti, ir prie izoteniskopo pritaikoma trumpoji manometro kojelė. Izoteniskopas pritaikomas prie vakuuminės sistemos, iš jos išsiurbiamas oras, po to užpildoma azotu. Sistemos išsiurbimas ir išvalymas kartojamas du kartus, kad būtų pašalinamas liekamasis deguonis. Užpildytas izoteniskopas dedamas horizontaliai, kad bandinys bandymo kolboje ir manometro sekcijoje (U dalis) pasklistų plonu sluoksniu. Slėgis sistemoje sumažinamas iki 133 Pa, o bandinys yra atsargiai šildomas, kol ima virti (ištirpusių sujungtųjų dujų pašalinimas). Tada izoteniskopas dedamas taip, kad bandinys vėl atsirastų kolboje ir trumpojoje manometro kojelėje ir, kad abu būtų pilni skysčio. Palaikomas toks pat slėgis kaip degazuojant; išsikišęs bandymo kolbos galiukas šildomas nedidelėje liepsnoje, kol išsiskyrę bandinio garai gerai pasklis ir išstums dalį bandinio iš viršutinės kolbos dalies ir manometro kojelės į izoteniskopą manometro sekciją, sudarydami garų pripildytą ir laisvą nuo azoto erdvę.

Po to izoteniskopas dedamas į pastovios temperatūros vonią, azoto slėgis reguliuojamas tol, kol jo slėgis tampa lygus mėginio slėgiui. Slėgio pusiausvyrą parodo izoteniskopą manometro sekcija. Pusiausvyros sąlygomis azoto garų slėgis yra lygus medžiagos garų slėgiui.

Kietosioms medžiagoms, atsižvelgiant į slėgį ir temperatūrų intervalą, yra naudojami manometro skysčiai, nurodyti 1.6.2.1. Tokiu atveju kietasis kūnas, kurį reikia ištirti, dedamas į kolbą ir degazuojamas padidintoje temperatūroje. Degazuotas manometro skystis pilamas į ilgosios izoteniskopą kojelės kolbelę. Po to izoteniskopas palenkiamas taip, kad manometre esantis skystis nutekėtų į U formos vamzdelį. Garų slėgis, kaip temperatūros funkcija, yra matuojamas pagal 1.6.2.

### 1.6.4. Efuzijos metodas: garų slėgio pusiausvyrą

#### 1.6.4.1. Aparatūra

Įvairūs aparatūros variantai yra apibūdinti literatūros 1 nuorodoje. Joje apibūdintas aparatas iliustruoja bendrą naudojamą principą (4 pav.). 4 paveiksle parodytos pagrindinės aparato sudedamosios dalys: tai aukšto vakuumo nerūdijančio plieno arba stiklo indas, įranga vakuumui sudaryti ir matuoti bei įmontuotos sudedamosios dalys garų slėgiui matuoti esant pusiausvyrai. Į aparatą įmontuotos šios sudedamosios dalys:

- garinimo krosnis su junge ir sukamąja išsiurbimo anga. Garinimo krosnis – tai cilindrinis indas, pavyzdžiui, iš vario arba chemiškai atsparaus, gero šiluminio laidumo lydinio. Taip pat galima naudoti stiklinį indą vario sienelėmis. Krosnies skersmuo apie 3–5 cm, aukštis – 2–5 cm. Garų srovė išleidžiama per skirtingo dydžio angas, kurių būna nuo vienos iki trijų. Krosnis šildoma apačioje esančia kaitinimo plokšte arba iš išorės

apvyniota spirale. Kad šiluma nebūtų veltui eikvojama pagrindinei plokštei kaitinti, šildytuvus ant pagrindinės plokštės tvirtinamas mažo terminio laidumo metalu (nikelio-sidabro arba chromo nikelio plienas), pvz., nikelio-sidabro vamzdelis pritaisomas prie sukamosios angos, jeigu naudojama krosnis su keliomis angomis. Šio įtaiso privalumas – galima prijungti varinį strypą. Tai sudaro sąlygas išorės aušinimui panaudojus aušinimo vonią,

- jeigu varinės krosnies dangtelyje yra trys skirtingo skersmens angos, viena nuo kitos esančios 90° kampu, galima apimti įvairius garų slėgio intervalus per visą matavimų intervalą (angų skersmuo apytikriai 0,30–4,50 mm). Didelės angos naudojamos mažam garų slėgiui ir atvirkščiai. Sukant krosnį galima nustatyti norimą angą arba tarpinę padėtį garų srovėje (krosnies skylė – skydas – svarstyklių lėkštė), išskirti molekulių srautą arba nukreipti jį per krosnies angą į svarstyklių lėkštę. Kad būtų išmatuota medžiagos temperatūra, termoelementas arba varžinis termometras dedamas tinkamoje vietoje,
- virš skydo yra labai jautrių mikrosvarstyklių lėkštė (žr. toliau). Svarstyklių lėkštės skersmuo yra apie 30 mm. Paausuotas aliuminis yra tam tinkanti medžiaga,
- svarstyklių lėkštė yra apgaubta cilindrinio žalvariniu arba variniu aušintuvu. Atsižvelgiant į svarstyklių rūšį jose yra angos svarstyklių svirtelei ir anga dangtyje molekulių srovei, kuri turėtų garantuoti visišką garų kondensaciją ant svarstyklių lėkštės. Šilumos išsiskyrimas į išorę, pavyzdžiui, yra užtikrinamas variniu strypeliu, sujungtu su aušintuvu. Strypelis yra ištraukiamas per pagrindinę plokštę ir nuo jos termiškai izoliuojamas, pavyzdžiui, chromo nikelio plieno vamzdeliu. Strypelis panardinamas į Diuaro indą su skystu azotu, esančiu po pagrindine plokšte, arba skystasis azotas cirkuliuoja strypeliu. Taip aušintuvus yra laikomas apytikriai – 120 °C temperatūroje. Svarstyklių lėkštė aušinama tik spinduliavimu, kurio pakanka, kad tiriamasis slėgio intervalas būtų pakankamas (aušinama apie 1 valandą iki matavimų pradžios),
- svarstyklės dedamos virš aušintuvo. Tinka, pavyzdžiui, labai jautrios svarstyklės, 2 pečių elektroninės mikrosvarstyklės (8) arba labai jautrus judamosios ritės prietaisas (žr. OECD Test Guideline 104, Edition 12.05.81),
- pagrindinėje plokštelėje taip pat yra elektrinės jungtys termoelementams (arba varžiniams termometrams) ir kaitinimo ritėms,
- vakuumas inde sudaromas naudojant dalinį vakuuminį siurblių (reikalingas vakuumas apytikriai  $1-2 \times 10^{-3}$  Pa, gaunamas po 2 valandų siurbimo). Slėgis reguliuojamas atitinkamu jonizacijos manometru.

#### 1.6.4.2. Matavimų eiga

Indas užpildomas tiriamąja medžiaga ir uždaromas dangteliu. Gaubtas ir aušintuvus įstumiami į krosnį. Aparatas uždaromas ir įjungiami vakuumo siurbliai. Slėgis prieš pradėdamas matavimus turėtų būti apie  $10^{-4}$  Pa. Aušinimas pradėdamas esant  $10^{-2}$  Pa.

Kai pasiekiamas reikalingas vakuumo lygis, pradėdama kalibravimo serija žemiausioje reikalaujamoje temperatūroje. Nustatoma atitinkama anga dangtelyje, garų srovė teka per gaubtą tiesiai virš angos, į ataušintą svarstyklių lėkštę. Svarstyklių lėkštė turi būti pakankamai didelė, kad visa per gaubtą nukreipta srovė patektų į ją. Garų srovės judesio kiekis veikia kaip jėga į svarstyklių lėkštę, ir molekulės kondensuojasi ant vėsiaus pavidaliaus.

Dėl vienkartinės ir vienalaikės kondensacijos reaguoja savirašis. Įvertinus signalus gaunama dviejų rūšių informacija:

1. Čia apibūdintame aparate garų slėgis yra nustatomas tiesiogiai pagal garų postūmio kiekį į svarstyklių lėkštę (šiuo atveju nereikia žinoti molekulinio svorio (2)). Kai vertinami parodymai, turi būti atsižvelgiama į tokius geometrinius veiksnius, kaip krosnies anga ir molekulinio srauto kampas.
2. Tuo pačiu metu kondensato masę galima matuoti ir taip galima apskaičiuoti garavimo koeficientą. Taip pat galima apskaičiuoti garų slėgį pagal garavimo koeficientą ir molekulinę svorį pagal Herzo lygtį (2).

$$p = G \sqrt{\left( \frac{(2\pi RT \times 10^3)}{(M)} \right)},$$

čia:

G = garavimo koeficientas ( $\text{kg s}^{-1} \text{m}^{-2}$ )

M = molinė masė ( $\text{g mol}^{-1}$ )

T = temperatūra (K)

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

p = garų slėgis (Pa)

Pasiekus reikalingą vakuumą, pradedami matavimai žemiausioje norimoje matavimų temperatūroje.

Tolesniems matavimams temperatūra didinama mažais intervalais, kol pasiekama didžiausia norima temperatūros vertė. Po to bandinys aušinamas ir galima užrašyti antrą garų slėgio kreivę. Jeigu antro matavimo metu nepavyksta patvirtinti pirmo matavimo rezultatų, gali būti, kad medžiaga irsta matuojamame temperatūros intervale.

### 1.6.5. Efuzijos metodas – masės praradimas

#### 1.6.5.1. Aparatūra

Efuzijos aparatą sudaro šios pagrindinės dalys:

- rezervuaras, kuriame galima nustatyti pastovią temperatūrą ir jį galima išsiurbti ir kuriame sudėtos efuzijos kiuvetės,
- aukšto vakuumo siurblys (pvz., difuzinis siurblys arba turbomolekulinis siurblys) su vakuumo matuokliu,
- gaudyklė, kurioje naudojamas suskystintas azotas arba sausasis ledas.

Kaip pavyzdys 5 paveiksle pavaizduotas elektra šildomas aliumininis vakuumo rezervuaras su 4 nerūdijančio plieno efuzijos kiuvetėmis. Apytikriai 0,3 mm storio nerūdijančio plieno folijoje yra 0,2–1,0 mm skersmens efuzijos antgaliai, prie efuzijos elemento pritaisyti įsriegiami dangteliai.

#### 1.6.5.2. Matavimo eiga

Etalonine ir tiriamąja medžiagomis užpildomas kiekviena efuzijos kiuvetė, metalinė diafragma su antgaliu yra apsaugota įsriegtu dangteliu, kiekviena kiuvetė pasverama 0,1 mg tikslumu. Kiuvetės dedamos į aparatą su nustatyta temperatūra, kuriame oras išsiurbiamas tiek, kad slėgis būtų viena dešimtąja mažesnis negu reikalaujama. Apibrėžtais laiko intervalais nuo 5 iki 30 valandų į aparatą įleidžiama oro, o efuzijos kiuvetės masės nuostolis nustatomas pakartotinai ją pasveriant.

Norint užtikrinti, kad lakiosios priemaišos neturėtų įtakos rezultatams, kiuvetė pakartotinai sverama apibrėžtais laiko intervalais, kad būtų patikrinama, ar garavimo greitis yra pastovus ne mažiau kaip du tokius laiko intervalus.

Garų slėgis p efuzijos kiuvetėje gaunamas:

$$p = \left( \frac{(m)}{(KAt)} \right) \sqrt{\left( \frac{(2\pi R T)}{(M)} \right)},$$

čia:

p = garų slėgis (Pa)

m = medžiagos, išeinančios iš elemento per laiką t, masė (kg)

t = laikas (s)

A = skylės plotas ( $\text{m}^2$ )

K = korekcijos koeficientas

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

T = temperatūra (K)



$M$  = molekulinė masė ( $\text{kg mol}^{-1}$ )

Korekcijos koeficientas  $K$  priklauso nuo cilindrinio antgalio ilgio santykio su jo spinduliu:

Koeficientas	0,1	0,2	0,6	1,0	2,0
$K$	0,952	0,909	0,771	0,672	0,514

Aukščiau pateikta lygtis gali būti užrašoma taip:

$$p = E \left( \frac{m}{t} \right) \sqrt{\left( \frac{T}{M} \right)},$$

čia  $E = \left( \frac{1}{KA} \right) \sqrt{2\pi R}$  ir tai yra efuzijos elemento konstanta.

Ši efuzijos kiuvetės konstanta  $E$  gali būti nustatoma su etaloninėmis medžiagomis (2,9) pagal šią lygtį:

$$E = \left( \frac{p(r)t}{m} \right) \sqrt{\left( \frac{M(r)}{T} \right)}$$

čia:

$p(r)$  = etaloninės medžiagos garų slėgis (Pa)

$M(r)$  = etaloninės medžiagos molekulinė masė ( $\text{kg} \cdot \text{mol}^{-1}$ )

#### 1.6.6. Dujų soties metodas

##### 1.6.6.1. Aparatūra

Tipišką aparatą, naudojamą šiam tyrimui atlikti, sudaro keletas sudedamųjų dalių, nurodytų 6a paveiksle, kurios apibūdinamos toliau (1).

##### *Inertinės dujos*

Nešančiosios dujos neturi sukelti cheminės reakcijos su tiriamąja medžiaga. Paprastai šiam tikslui tinka azotas, bet kartais gali būti reikalingos kitos dujos (10). Naudojamos dujos turi būti sausas (žr. 6a paveikslą, 4 punktą: santykinio drėgnumo jutiklis).

##### *Srauto kontrolė*

Atitinkama dujų kontrolės sistema yra reikalinga tam, kad būtų užtikrintas per soties kolonėlę judančio srauto greičio ir savybių pastovumas.

##### *Garų surinkimo gaudyklės*

Jos priklauso nuo tam tikrų bandinio ypatybių ir pasirinkto analizės metodo. Garai turi būti sugaunami kiekybiškai ir tolesnei analizei tinkamoje formoje. Tam tikroms tiriamosioms medžiagoms tinka gaudyklės su tokiais skysčiais kaip heksanas arba etilenglikolis. Kitoms medžiagoms gali būti naudojami kietieji absorbentai.

Kaip garų sugaudymo ir po to atliekamos analizės alternatyva gali būti naudojama betarpiška tyrimų technika, pavyzdžiui, chromatografas, gali būti naudojama kiekybiškai nustatyti kiekį medžiagos, perneštos žinomu kiekiu nešančiųjų dujų. Be to, galima išmatuoti mėginio masės nuostolius.

##### *Šilumokaitis*

Matuojant skirtingose temperatūrose gali reikėti į agregatą įmontuoti šilumokaitį.

*Soties kolonėlė*

Tiriamos medžiagos tirpalas užpilamas ant atitinkamo inertinio nešiklio. Apdengtas nešiklis dedamas į soties kolonėlę, kurios dydžiai ir srauto greitis turėtų būti tokie, kad būtų užtikrinta visiška nešančiųjų dujų sotis. Soties kolonėlėje turi būti pastovi temperatūra. Matuojant aukštesnėje negu kambario temperatūroje, vieta tarp soties kolonėlės ir gaudyklės turėtų būti šildoma, kad būtų išvengta tiriamos medžiagos kondensacijos.

Kad būtų sumažintas masės pernešimas dėl difuzijos, kapiliarinis vamzdelis gali būti įtaisomas už soties kolonėlės (6b pav.)

1.6.6.2. *Matavimo darbo eiga**Soties kolonėlės paruošimas*

Tiriamos medžiagos tirpalas labai lakiam tirpiklyje pridedamas į atitinkamą nešiklio kiekį. Turėtų būti dedamas pakankamas kiekis bandinio, kad tyrimo metu išliktų sotis. Visas tirpiklis išgarinamas ore arba sukamajame garintuve, ir gerai išmaišyta medžiaga dedama į soties kolonėlę. Nustačius pastovią bandinio temperatūrą, sausas azotas leidžiamas per aparatą.

*Matavimas*

Gaudyklės arba betarpiškai įtaisytas detektorius yra sujungti su kolonėlės nutekamuju vamzdeliu, užrašomas laikas. Srauto greitis yra tikrinamas pradžioje ir reguliariais intervalais eksperimento eigoje, naudojant barboterį (arba visą laiką – debitmačiu).

Turi būti matuojamas slėgis prie sotintuvo išėjimo angos. Tai gali būti daroma vienu iš būdu:

- a) įmontuojant manometrą tarp sotintuvo ir gaudyklės (to gali nepakakti, kadangi taip padidėja įrangos užimama erdvė ir adsorbcinis paviršius); arba
- b) nustatant staigų slėgio mažėjimą visoje konkrečioje gaudymo sistemoje, atskirame eksperimente naudojamą kaip srauto greičio funkcija (tai gali nelabai tikti skysčių gaudyklėms).

Laikas, reikalingas surinkti tokį tiriamos medžiagos kiekį, reikalingą skirtingiems analizės metodams, yra nustatomas atliekant išankstinius matavimus arba apskaičiavimus. Medžiagos surinkimas tolesniems mėginiams gali vykti naudojant betarpiškai įmontuotą kiekio tyrimo techniką (pvz., chromatografą). Prieš apskaičiuojant garų slėgį tam tikroje temperatūroje, turi būti atliekami išankstiniai matavimai, norint nustatyti didžiausią srauto greitį, kuris visiškai išotins nešančiąsias dujas medžiagos garais. Tai garantuojama, jeigu nešančiosios dujos yra leidžiamos per sotintuvą pakankamai lėtai, kad mažesnis greitis nesukeltų didesnio apskaičiuotojo garų slėgio.

Specialus analizės metodas nustatomas pagal tiriamos medžiagos prigimtį (pvz., dujų chromatografija arba gravimetrija).

Nustatomas medžiagos kiekis, perneštos žinomu nešančiųjų dujų tūriu.

1.6.6.3. *Garų slėgio apskaičiavimas*

Garų slėgis apskaičiuojamas pagal garų slėgį (W/V) tokia lygtimi:

$$p = \left( \frac{W}{V} \right) \times \left( \frac{RT}{M} \right),$$

kai:

- p = garų slėgis (Pa)  
W = išgarinto bandinio masė (g)  
V = išotintų dujų tūris (m<sup>3</sup>)  
R = universalioji molinė dujų konstanta (J mol<sup>-1</sup> K<sup>1</sup>)  
T = temperatūra (K)  
M = tiriamos medžiagos molinė masė (g mol<sup>-1</sup>)

Matuojamiems tūriams turi būti koreguojami debitmačio ir sotintuvo su nustatyta temperatūra slėgio bei temperatūrų skirtumai. Jeigu debitmatis yra žemiau garų gaudyklės, koregavimas gali būti reikalingas atsižvelgiant į išgarintos gaudyklės ingredientus (1).

#### 1.6.7. Sukamasis rotorius (8, 11, 13)

##### 1.6.7.1. Aparatūra

Sukamojo rotoriaus metodu gali būti naudojamas sukamojo rotoriaus klampumo matuoklis, kaip parodyta 8 paveiksle. Eksperimentinės konstrukcijos schema parodyta 7 paveiksle.

Paprastai matavimo aparatas susideda iš sukamojo rotoriaus matavimo galvutės, įdėtos į apvaskalą su nustatyta temperatūra (reguliuojama 0,1 °C ribose). Konteineris su mėginiu dedamas į apvaskalą su nustatyta temperatūra (reguliuojama 0,01 °C ribose), o visos kitos konstrukcijos dalys yra laikomos aukštesnėje temperatūroje, kad būtų išvengiama kondensacijos. Aukštą vakuumą užtikrinantis siurblys sujungiamas su aukštą vakuumą užtikrinančiais vožtuvais.

Sukamojo rotoriaus matavimo galvutę sudaro vamzdyje esantis plieninis rutuliukas (4–5 mm skersmens). Rutuliukas kybo magnetiniame lauke, jam stabilizuoti paprastai naudojamas nuolatinio magneto ir reguliavimo ričių derinys.

Rutuliukas sukamas ričių sukeliama sukamuoju lauku. Palaikančios ritės, matuojančios visada egzistuojantį žemą šoninį rutuliuko įmagnetinimą, naudojamos išmatuoti jo sukimosi greitį.

##### 1.6.7.2. Matavimų eiga

Kai rutuliukas pasiekia tam tikrą sukimosi greitį  $v(o)$  (paprastai apie 400 sūkių per sekundę), tolesnis energijos padavimas liaujasi ir dėl dujų trinties įvyksta stabdymas.

Sukimosi greičio sumažėjimas matuojamas kaip laiko funkcija. Kadangi trintis dėl magnetinio sustabdymo palyginti su dujų trintimi yra nežymi, dujų slėgis  $p$  apskaičiuojamas taip:

$$p = \left( \frac{\pi(\bar{c})r\rho}{\sigma 10t} \right) \times \ln \left( \frac{v(t)}{v(o)} \right)$$

čia:

$\bar{c}$  = vidutinis dujų molekulių greitis

$r$  = rutuliuko spindulys

$p$  = rutuliuko tankis

$\sigma$  = liestinio judesio kiekio perdavos koeficientas ( $\epsilon = 1$ , kai rutuliuko paviršius idealiai sferinis)

$t$  = laikas

$v(t)$  = sukimosi greitis, praėjus laikui  $t$

$v(o)$  = pradinis sukimosi greitis

Ši lygtis gali būti užrašyta taip:

$$p = \left( \frac{\pi(\bar{c})r\rho}{10\sigma} \right) \times \left( \frac{t_n - t_{n-1}}{t_n \times t_{n-1}} \right)$$

čia  $t_n$ ,  $t_{n-1}$  yra laikas, reikalingas tam tikram apsisukimų skaičiui  $N$  atlikti. Šie laiko intervalai  $t_n$  ir  $t_{n-1}$  eina vienas paskui kitą, o  $t_n > t_{n-1}$ .

Vidutinis dujų molekulių greitis apskaičiuojamas pagal:

$$\bar{c} = \left( \frac{8RT}{\pi M} \right)^{\left( \frac{1}{2} \right)}$$

čia:

$T$  = temperatūra

R = universalioji molinė dujų konstanta

M = molio masė

## 2. DUOMENYS

Bet kuriame iš ankstesnių metodų garų slėgis turėtų būti nustatomas naudojant mažiausiai dvi temperatūras. Kai ribos yra nuo 0 iki 50 °C, norint patikrinti garų slėgio kreivės tiesiškumą, reikėtų naudoti tris arba daugiau temperatūrų.

## 3. ATASKAITOS PATEIKIMAS

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

- taikytas tyrimo metodas;
- tikslus medžiagos apibūdinimas (tapatumas ir priemaišos) ir išankstinio gryninimo pakopa, jeigu tokia yra,
- mažiausiai dvi slėgio ir temperatūros vertės intervale nuo 0 °C iki 50 °C,
- visi neapdoroti duomenys,
- $\log p$  ir  $1/T$  santykio kreivė,
- garų slėgio apskaičiavimas ribose, esant 20 arba 25 °C.

Jei pastebimas kitimas (medžiagos būklės keitimasis, skilimas), reikia pažymėti šią informaciją:

- keitimosi pobūdis,
- temperatūra, kurioje esant atmosferiniam slėgiui prasideda keitimasis,
- garų slėgis 10 ir 20 °C žemiau keitimosi temperatūros ir 10 ir 20 °C aukščiau šios temperatūros (nebent keitimasis yra iš kietos į dujinę būseną).

Visa rezultatų aiškinimui svarbi informacija ir pastabos turi būti pateikiamos ataskaitoje, ypač reikia pateikti informaciją apie medžiagos priemaišas ir fizinę būklę.

## 4. NUORODOS

- 1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 104, Decision of the Council C(81) 30 final.
- 2) Ambrose, D. in B. Le Neindre, B. Vodar, (Eds.): Experimental Thermodynamics, Butterworths, London, 1975, Vol II.
- 3) R. Weissberger ed.: Technique of Organic Chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed. Chapter IX, Interscience Publ., New York, 1959, Vol. I, Part I.
- 4) Knudsen, M. Ann. Phys. Lpz., 1909, vol. 29, 1979; 1911, vol. 34, p. 593.
- 5) NF T 20–048 AFNOR (Sept. 85). Chemical products for industrial use – Determination of vapour pressure of solids and liquids within range from  $10^{-1}$  to  $10^5$  Pa – Static method.

- 6) NF T 20-047 AFNOR (Sept. 85). 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.
- 7) ASTM D 2879-86, Standard test method for vapour pressure- temperature relationship and initial decomposition temperature of liquids by isoteniscope.
- 8) G. Messer, P. Rohl, G. Grosse and W. Jitschin. J. Vac. Sci. Technol.(A), 1987, Vol. 5 (4), p. 2440.
- 9) Ambrose, D.; Lawrenson, I.J.; Sprake, C.H.S. J. Chem. Thermodynamics 1975, vol. 7, p. 1173.
- 10) B.F. Rordorf. Thermochemica Acta, 1985, vol. 85, p. 435.
- 11) G. Comsa, J.K. Fremerey and B. Lindenau. J. Vac. Sci. Technol., 1980, Vol. 17 (2), p. 642.
- 12) G. Reich. J. Vac. Sci. Technol., 1982, vol. 20 (4), p. 1148.
- 13) J.K. Fremerey. J. Vac. Sci. Technol.(A), 1985, Vol. 3 (3), p. 1715.

## 1 Priedėlis

## Apskaičiavimo metodas

## ĮVADAS

Apskaičiuotosios garų slėgio vertės gali būti naudojamos:

- nusprendžiant, kuris eksperimentinis metodas tinkamas,
- pateikiant apskaičiavimus arba ribinę vertę tais atvejais, kai eksperimentinio metodo negalima taikyti dėl techninių priežasčių (taip pat ir kai garų slėgis labai žemas),
- padėti nustatyti tuos atvejus, kai pagrįstai neatliekami eksperimentiniai matavimai, kadangi aplinkos temperatūroje garų slėgis gali būti < 10–5 Pa.

## APSKAIČIAVIMO METODAS

Skystųjų ir kietųjų kūnų garų slėgis gali būti apskaičiuojamas naudojant pakeistą Watson koreliaciją (a). Vieninteliai reikalingi eksperimentiniai duomenys – tai normali virimo temperatūra. Metodas turi būti taikomas visame slėgių intervale nuo  $10^5$  Pa iki  $10^{-5}$  Pa.

Išsami informacija apie metodą pateikta leidinyje „Handbook of Chemical Property Estimation Methods“ (b).

## APSKAIČIAVIMŲ TVARKA

Pagal b nuorodą garų slėgis apskaičiuojamas taip:

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

čia:

T = norima temperatūra

$T_b$  = normali virimo temperatūra

$P_{vp}$  = garų slėgis temperatūroje T

$\Delta H_{vb}$  = garinimo šiluma

$\Delta Z_b$  = spūdumo koeficientas (apskaičiuotas esant 0,97)

m = empirinis koeficientas, priklausantis nuo fizikinės būsenos norimoje temperatūroje

Toliau

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

čia  $K_F$  – empirinis koeficientas atsižvelgiant į medžiagos poliškumą. Kelių junginių rūšims  $K_F$  koeficientai yra išvardyti b nuoro-doje.

Gana dažnai galima gauti duomenis, kur virimo temperatūra pateikiama sumažintame slėgyje. Tokiu atveju pagal b nuoro-dą garų slėgis apskaičiuojamas taip:

$$\ln P_{vp} \approx \ln P_1 + \frac{(\Delta H_{v1})}{(\Delta Z_b RT_1)} \left[ 1 - \left(3 - 2 \frac{(T)}{(T_1)}\right)^m \frac{(T_1)}{(T)} - 2m \left(3 - 2 \frac{(T)}{(T_1)}\right)^{m-1} \ln \frac{(T)}{(T_1)} \right]$$

čia  $T_1$  – virimo temperatūra sumažintame slėgyje P1.

#### ATASKAITA

Naudojant apskaičiavimo metodą ataskaitoje pateikiama išsami apskaičiavimų dokumentacija.

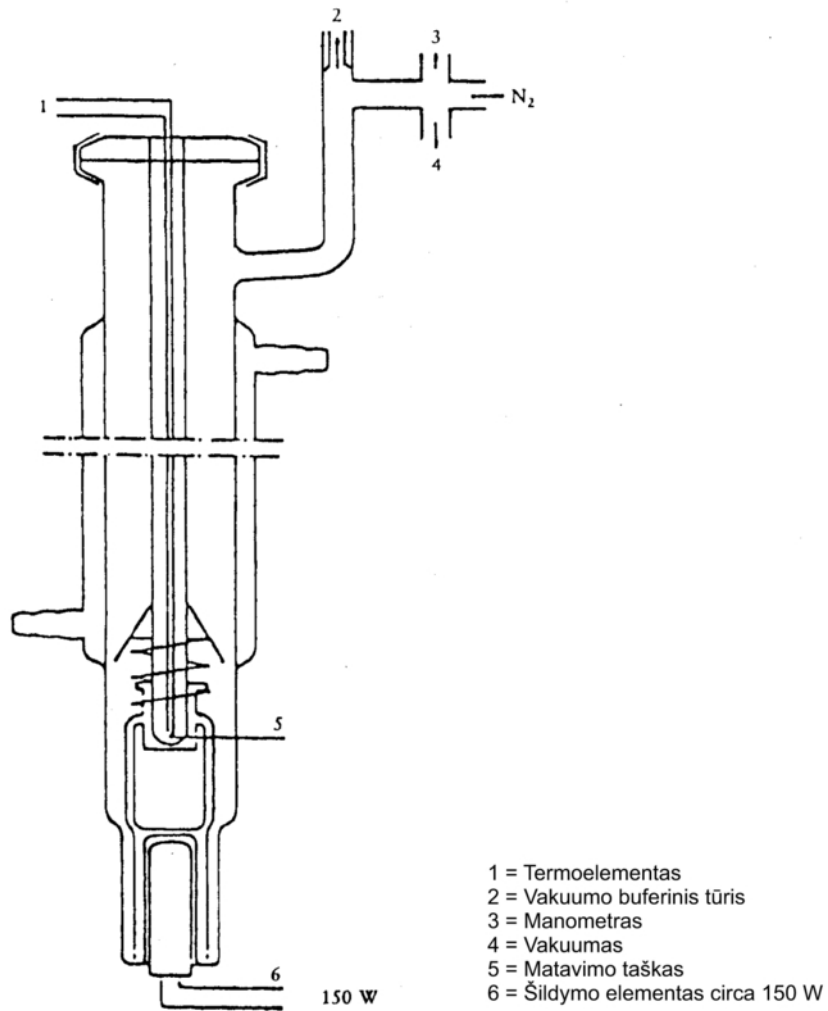
#### NUORODOS

- a) K.M. Watson, Ind. Eng. Chem; 1943, vol. 35, p. 398.
- b) W.J. Lyman, W.F. Reehl, D.H. Rosenblatt. Handbook of Chemical Property Estimation Methods, Mc Graw-Hill, 1982.

## 2 priedėlis

## 1 paveikslas

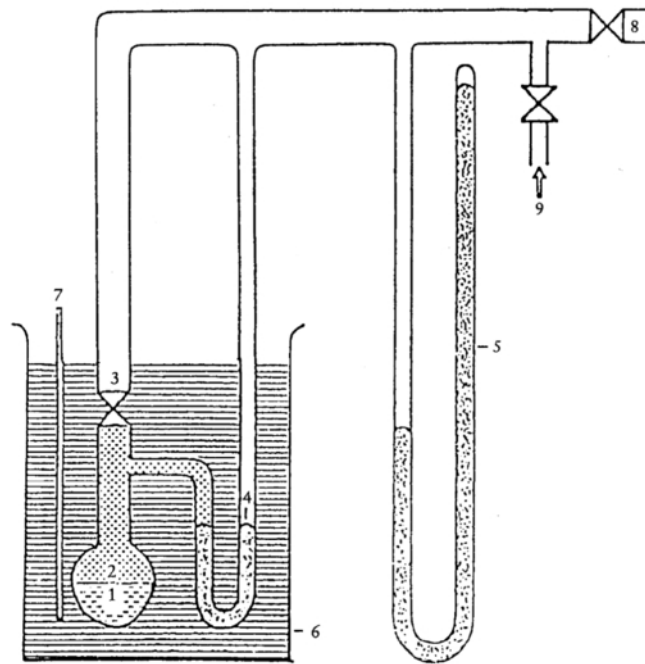
## Garų slėgio kreivės nustatymo pagal dinaminį metodą aparatūra





## 2a paveikslas

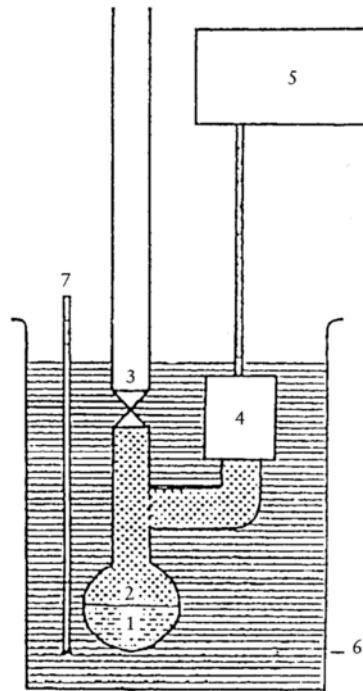
Garų slėgio kreivės nustatymo pagal statinį metodą (naudojant U formos manometrą) aparatūra



- |                                     |                                     |
|-------------------------------------|-------------------------------------|
| 1. Mėginys                          | 6. Vonia su nustatoma temperatūra   |
| 2. Garų fazė                        | 7. Temperatūros matavimo prietaisas |
| 3. Didelio vakuumo vožtuvas         | 8. Vakuumo siurblys                 |
| 4. U formos (papildomas) manometras | 9. Ventiliacija                     |
| 5. Manometras                       |                                     |

## 2b paveikslas

## Garų slėgio kreivės nustatymo pagal statinį metodą (naudojant slėgio indikatorių) aparatūra

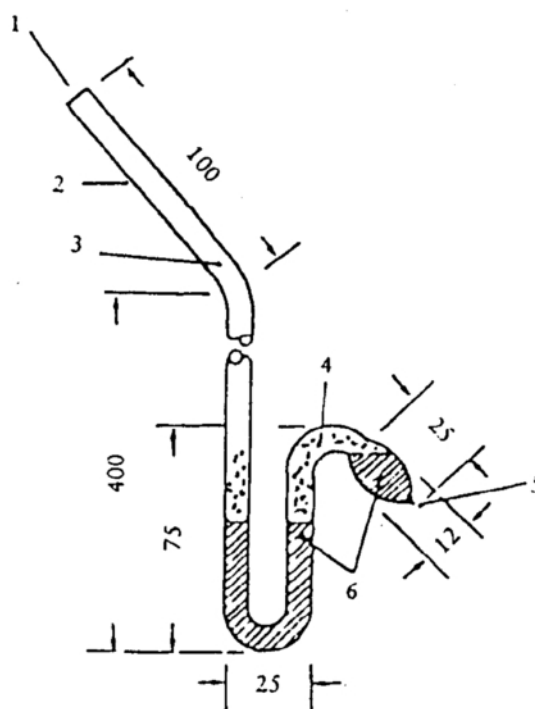


1. Mėginys
2. Garų fazė
3. Didelio vakuumo vožiuvas
4. Slėgio matuoklis

5. Slėgio indikatorius
6. Vonia su nustatoma temperatūra
7. Temperatūros matavimo prietaisas

3 paveikslas

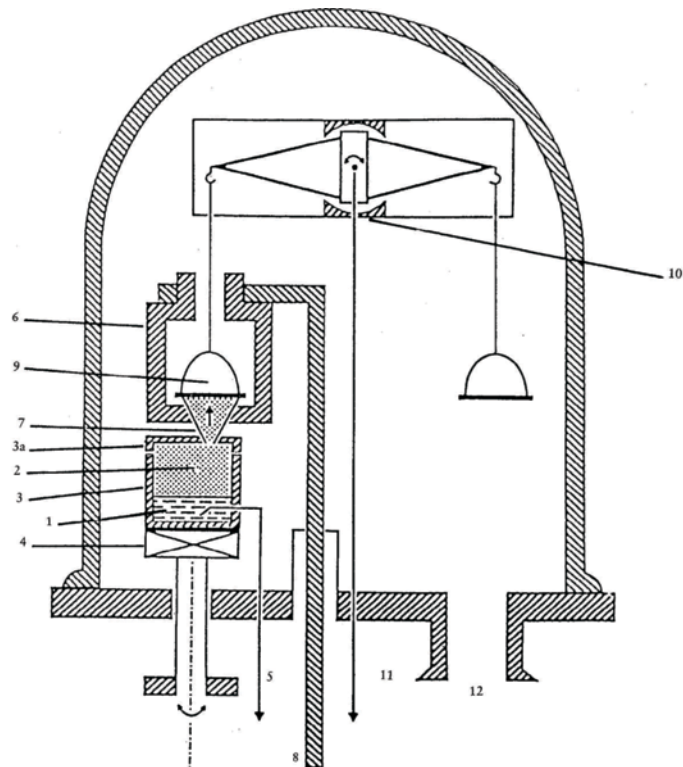
## Izoteniskopas (žr. 7 nuorodą)



1. | slėgio kontrolės ir matavimo sistema
2. 8 mm OD vamzdelis
3. Sausas azotas slėgio sistemoje
4. Mėginio garai
5. Mažas antgalis
6. Skystas mėginys

## 4 paveikslas

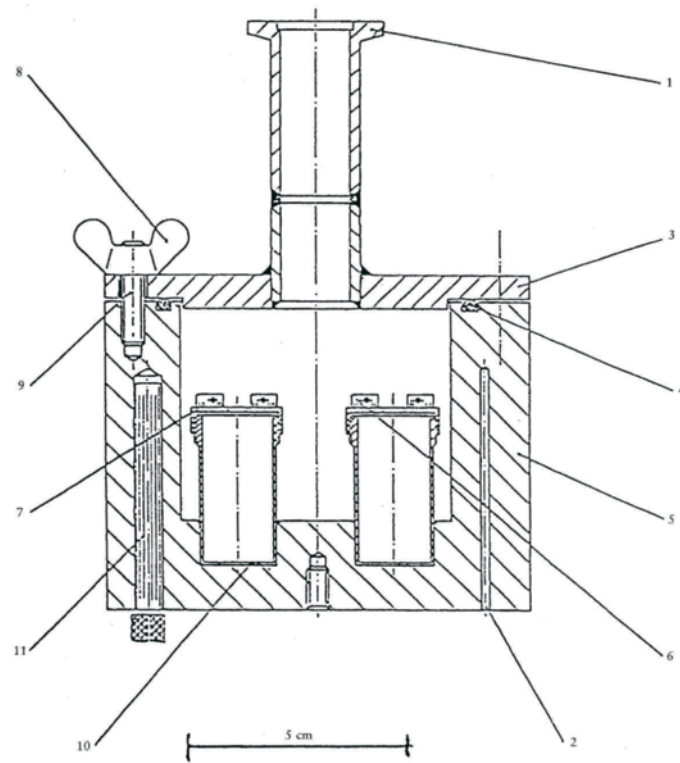
## Garų slėgio kreivės nustatymo pagal garų slėgio pusiausvyros metodą aparatūra



- |   |                                  |
|---|----------------------------------|
| 1. Mėginys                                      | 7. Gaubtas                       |
| 2. Garų fazė su garų srove                      | 8. Šaldymo dėžės šaldymo strypas |
| 3. Garinimo krosnis su sukamąja įsiurbimo anga; | 9. Svarstyklių lėkštė            |
| 3a. Krosnies dangtis su anga                    | 10. Mikrosvarstyklės             |
| 4. Krosnies šildymas (šaldymas)                 | 11. Į savirašį                   |
| 5. Mėginio temperatūros matavimas               | 12. Į didelio vakuumo siurbį     |
| 6. Šaldymo dėžė                                 |                                  |

## 5 paveikslas

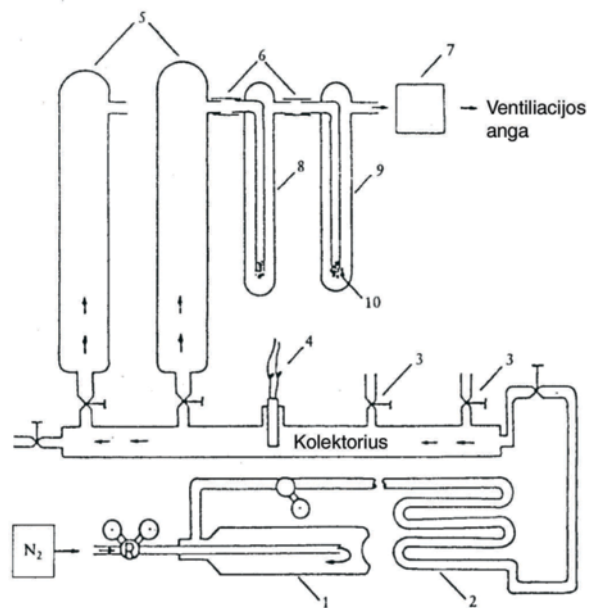
Aparatūros garinimui žemame slėgyje efuzijos metodu, efuzijos kiuvetės tūris 8 cm<sup>3</sup>, pavyzdys



- 1 Jungtis su vakuumu
- 2 Ertmės platinos varžiniams termometrams arba temperatūrai matuoti bei kontroliuoti (2)
- 3 Vakuomo rezervuaro dangtis
- 4 O formos žiedas
- 5 Aliumininis vakuomo rezervuaras
- 6 Prietaisas efuzijos kiuvetėms įtaisyti ir išimti
- 7 Įsriegiamas dangtis
- 8 Sparnuotosios veržlės (6)
- 9 Varžtai (6)
- 10 Nerūdijančio plieno efuzijos kiuvetės
- 11 Kaitinimo elementai (6)

## 6a paveikslas

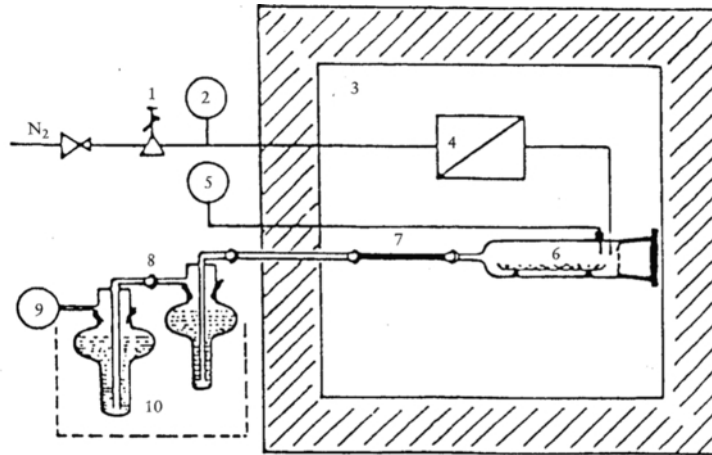
## Srauto sistemos pavyzdys garų slėgiui nustatyti dujų soties metodu



- 1 = Srauto reguliatorius
- 2 = Šilumokaitis
- 3 = Adatiniai vožtuvai
- 4 = Santykinio drėgnio jutiklis
- 5 = Soties kolonėlės
- 6 = PTFE jungtys
- 7 = Debitmatis
- 8 = Gaudyklė (absorberis)
- 9 = Alyvos gaudyklė
- 10 = Frituotasis barboteris

## 6b paveikslas

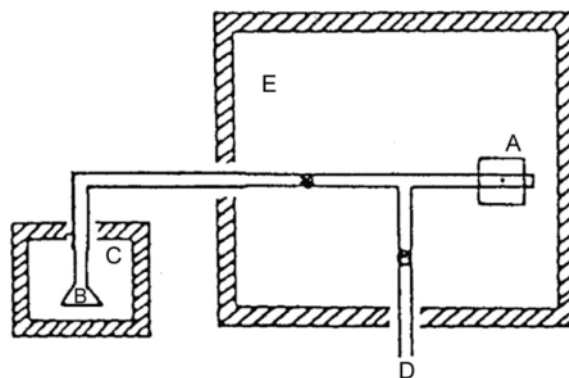
Garų slėgio nustatymo dujų soties metodu pavyzdys su kapiliariniu vamzdeliu, įtaisytu už išotinio kameros sistemos



- |   |                           |
|---|---------------------------|
| 1. Terminis masės debitmatis                    | 6. Dujų išotinio kameros  |
| 2. Manometras                                   | 7. Kapiliarinis vamzdelis |
| 3. Kamera su kontroliuojama temperatūra         | 8. Absorbcijos indai      |
| 4. Nešančiųjų dujų ritė, nustatanti temperatūrą | 9. Dujomatis              |
| 5. Termometras (Pt 100)                         | 10. Šaltoji gaudyklė      |

## 7 paveikslas

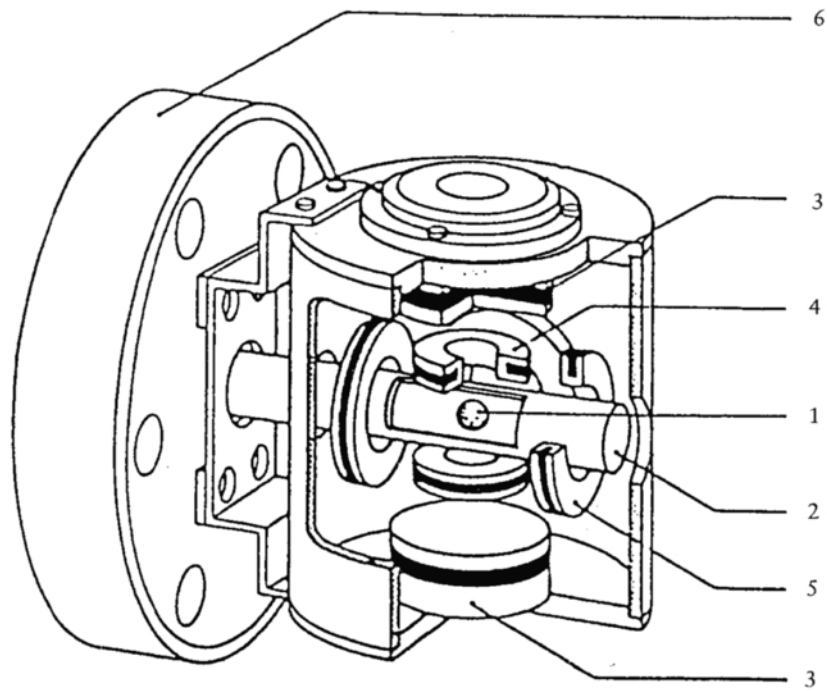
Ekspirimentinės įrangos pavyzdys sukamojo rotoriaus metodu



- Garų slėgio aparatas
- A. Sukamojo rotoriaus jutiklio galvutė;
  - B. Mėginio elementas;
  - C. Termostatas;
  - D. Vakuomo linija (turbosiuurblys);
  - E. Oro termostatas.

## 8 paveikslas

## Sukamojo rotoriaus matavimo galvutės pavyzdys



1. Rutuliukas;
2. 6 išsiurbtas vamzdinis ilgintuvas;
3. Nuolatiniai magnetai (2);
4. Ritės (2) vertikaliai stabilizacijai;
5. Varančiosios ritės (4);
6. Jungiamasis tarpiklis.



## A.5. PAVIRŠIAUS ĮTEMPTIS

## 1. METODAS

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

## 1.1. ĮVADAS

Apibūdinieji metodai turi būti taikomi vandeninių tirpalų paviršiaus įtempties matavimuose.

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

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

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

## 1.2. APIBRĖŽTYS IR VIENETAI

Gibso paviršiaus energija vienam paviršiaus vienetui vadinama paviršiaus įtemptimi.

Paviršiaus įtempis nurodoma:

N/m (SI vienetais) arba

mN/m (SI pogrupiais)

1 N/m =  $10^3$  dinų/cm

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

## 1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

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

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

## 1.4. METODŲ PRINCIPAS

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

## 1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

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

## 1.6. METODŲ APIBŪDINIMAS

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

1.6.1. **Plokštelės metodas**

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

1.6.2. **Ašelės metodas**

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

1.6.3. **Žiedo metodas**

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

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

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

- kilnojamasis mėginio stalelis,
- matavimo sistema,
- matavimo žiedas,
- matavimo indas.

## 1.6.4.1.1. Kilnojamasis mėginio stalelis

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

## 1.6.4.1.2. Jėgos matavimo sistema

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

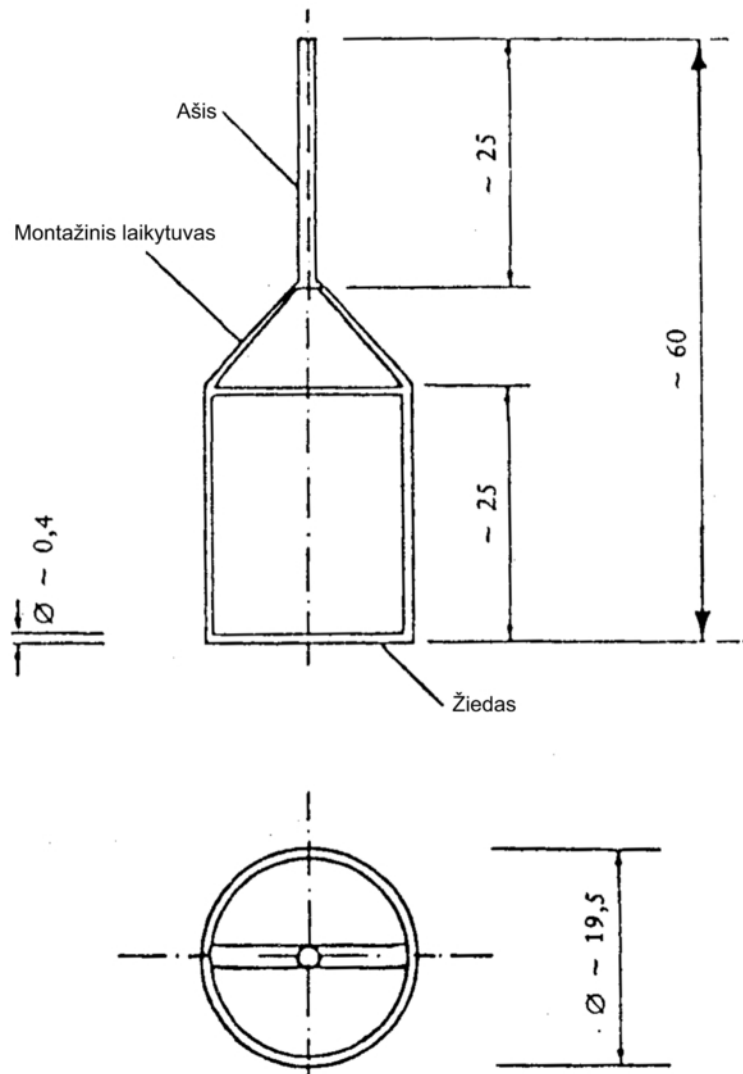
## 1.6.4.1.3. Matavimo kūnas (žiedas)

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

Paveikslas

**Matavimo kūnas**

(Visi matmenys nurodyti milimetrais)



## 1.6.4.1.4. Matavimo indas

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

## 1.6.4.2. Aparatūros paruošimas

## 1.6.4.2.1. Valymas

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

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

*Pastaba*

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

## 1.6.4.2.2. Aparato kalibravimas

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

*Montavimas*

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

*Nulinio taško derinimas*

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

*Kalibravimas*

Tikrasis bandymo kalibravimas gali būti atliekamas dviem būdais:

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

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

čia:

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

m = svarelis masė (g)

g = laisvojo kritimo pagreitis (981 cm s<sup>-2</sup> jūros lygyje)

b = vidutinis žiedo perimetras (cm)

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

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

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

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

čia:

$\sigma_o$  = vandens paviršiaus įtępties vertė, nurodyta literatūroje (mN/m)

$\sigma_g$  = išmatuota vandens paviršiaus įtępties vertė (mN/m), abi vienodoje temperatūroje

## 1.6.4.3. Bandinių paruošimas

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

Tirpalas turi būti laikomas pastovioje temperatūroje ( $\pm 0,5$  °C). Kadangi tirpalo, esančio matavimo inde, paviršius įtemptis kinta laike, atliekami keli matavimai skirtingu laiku ir brėžiama kreivė, parodanti paviršiaus įtempį 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. Bandyimo sąlygos

Matavimai atliekami apytikriai 20 °C temperatūroje ir kontroliuojami  $\pm 0,5$  °C ribose.

#### 1.6.6. Darbo eiga

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

## 2. DUOMENYS

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

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

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 įtempies verčių skaitymo tvarka tiesiogiai iš šios lentelės. (Interpoliacija turi būti naudojama parodymams, svyruojantiems tarp lentelėje pateiktų verčių).

### Lentelė

#### Matuotos paviršiaus įtempies korekcija

Tik vandeniniams tirpalams,  $\rho = 1 \text{ g/cm}^3$

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

Eksperimentinė vertė (mN/m)	Koreguotoji vertė (mN/m)	
	Kalibravimas pagal svorį (žr. 1.6.4.2.2 (a))	Kalibravimas pagal vandenį (žr. 1.6.4.2.2 (b))
20	16,9	18,1
22	18,7	20,1
24	20,6	22,1

Eksperimentinė vertė (mN/m)	Koreguotoji vertė (mN/m)	
	Kalibravimas pagal svorį (žr. 1.6.4.2.2 (a))	Kalibravimas pagal vandenį (žr. 1.6.4.2.2 (b))
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
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  $\rho = 1 \text{ g/cm}^3$ ) 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 vielos spindulys). Lentelėje yra pateiktos koreguotos paviršiaus įtempties matavimų vertės, paimtos po kalibravimo su svareliais arba kalibravimo su vandeniu.

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

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

čia:

- F = jėga, išmatuota dinamometru plėvelės nutrūkimo taške
- R = žiedo spindulys
- f = korekcijos koeficientas (1)

**3. ATASKAITOS PATEIKIMAS****3.1. BANDYMO ATASKAITA**

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

- naudotas metodas,
- naudoto vandens arba tirpalo rūšis,
- tikslus ir išsamus medžiagos apibūdinimas (tapatumas ir priemaišos),
- matavimo rezultatai: paviršiaus įtempis (parodymai), nurodant tiek atskirus parodymus ir jų aritmetinį vidurkį, tiek koreguotą vidurkį (atsižvelgiant į įrangą ir korekcijos lentelę),
- tirpalo koncentracija,
- bandymo temperatūra,
- kiek laiko buvo laikomas naudotas tirpalas; ypač laikas nuo paruošimo iki tirpalo matavimo,
- paviršiaus įtempies priklausomybės nuo laiko, perpylus tirpalą į matavimo indą apibūdinimas,
- turi būti nurodoma visa informacija ir pastabos, svarbios rezultatų aiškinimui, ypač atsižvelgiant į priemaišas ir medžiagos fizikinę būseną.

**3.2. REZULTATŲ AIŠKINIMAS**

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

**4. NUORODOS**

- 1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 115, Decision of the Council C(81) 30 final.
- 2) R. Weissberger ed.: Technique of Organic Chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed., Interscience Publ., New York, 1959, Vol. I, Part I, Chapter XIV
- 3) Pure Appl. Chem., 1976, vol. 48, p. 511.
- 4) Harkins, W.D., Jordan, H.F., J. Amer. Chem. Soc., 1930, vol. 52, p. 1751.

## A.6. TIRPUMAS VANDENYJE

## 1. METODAS

Apibūdintasis metodas yra pagrįstas OECD Bandymų gairėmis (1).

## 1.1. ĮVADAS

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

Nėra vieno metodo, apimančio visą tirpumo vandenyje intervalą.

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

- vienas, kuris taikomas iš tikrųjų grynomis mažo tirpumo medžiagoms ( $< 10^{-2}$  gramų viename litre), ir kurios stabilios vandenyje, vadinamas „kolonėlės eliuavimo metodu“,
- kitas, kuris taikomas iš tikrųjų grynomis didesnio tirpumo medžiagoms ( $> 10^{-2}$  gramų viename litre) ir kurios yra pastovios vandenyje, vadinamas „kolbos metodu“.

Tiriamosios medžiagos tirpumą vandenyje gali stipriai paveikti joje esančios priemaišos.

## 1.2. APIBRĖŽTIS 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  $\text{kg/m}^3$  (taip pat gali būti naudojama gramai litre).

## 1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

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

## 1.4. BANDYMO METODO PRINCIPAS

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

## 1.4.1. Kolonėlės eliuavimo 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 parodo koncentracijos kreivės plokščioji dalis kaip laiko funkcija.

## 1.4.2. Kolbos metodas

Šiuo metodu medžiaga (kietosios medžiagos turi būti susmulkintos) 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 įrangose dalyse.

1.6.2. **Išankstinis bandymas**

Į 10 ml graduotą cilindrą su šlifo kamščiu kambario temperatūroje įberiama apytikriai 0,1 g bandinio (kietosios medžiagos turi būti susmulkintos), ir 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

Kiekvieną kartą įpylus nurodytą kiekį vandens, mišinys stipriai kratomas 10 minučių ir vizualiai tikrinama, ar nėra neištirpusių mėginio dalelių. Jeigu, pridėjus 10 ml vandens, bandinys arba jo dalys neištirpsta, eksperimentas turi būti pakartojamas 100 ml matavimo cilindre su didesniais vandens tūriais. 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 pridedamo vandens tūryje, kuriame bandinys 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 distiliuotas 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 reiškinį ant pagalbinės medžiagos paviršiaus.

Pagalbinės medžiagos pakrovimas gali sukelti problemų (klaidingi rezultatai), jeigu tiriamoji medžiaga yra nusodinama kaip alyva arba skirtinga kristalų 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.

*Bandyimo eiga*

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

- recirkuliaciniu siurbliu (žr. 1 paveikslą),
- lyginamuoju indu (žr. 4 paveikslą).

#### 1.6.3.3. *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, pakeičiantis penkis pradinius su priemaisomis pašalinamus sluoksnio tūrius.

Kolonėlė turėtų būti sujungta su recirkuliaciniu siurbliu, kuriuo galima kontroliuoti apytikriai 25 ml/val. srautas. Siurblys sujungiamas politetrafluoretileno (P.T.F. E) ir (arba) stiklinėmis jungtimis. Sumontavus kolonėlę su siurbliu turi būti galimybė 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 peristaltinis siurblys arba membraninis siurblys (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 (apibūdinti 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 pasiekiamas pusiausvyra, kaip nustatyta penkiais vienas po kito dedamais bandiniais, kurių koncentracijos skiriasi ne daugiau kaip  $\pm 30\%$  juos atsitiktinai parenkant. Šie bandiniai 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 išlyginamuoju indu*

*Aparatūra* (žr. 3 ir 4 pav.)

Išlyginamasis indas: išlyginamojo indo jungtis yra padaroma iš šlifoto 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.

Abiem atvejais (naudojant recirkuliacinį siurblią arba išlyginamąjį indą) viską reikia dar kartą pakartoti su puse pirmojo debito kiekiu. 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 siurblių arba išlyginamąjį indą) frakcijos turėtų būti patikrinamos, ar nėra koloidinių dalelių, tikrinant, ar nėra Tindalio reiškinio (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,
- prietaisais, tinkantis tirpalams suplakti kontroliuojamoje pastovioje temperatūroje,
- centrifuga (geriau su reguliuojama temperatūra), jeigu reikia, su emulsijomis, ir
- įrenginys analiziniam 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 mėgintuvėliai, kolbos). Pasirinktas vandens kiekis pilamas į kiekvieną indą, kiekvienas indas sandariai užkemšamas. Užkimšti indai purtomi 30 °C temperatūroje. (Turėtų būti naudojamas purtyklė 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 papurtant. Inde esantis turinys centrifuguojamas bandymo temperatūroje, mėginio koncentracija skaidrioje vandeninėje fazėje nustatoma atitinkamu analizės metodu. Su kitomis dviem kolbomis elgiamasi taip pat, prieš tai nustatant pradinę pusiausvyrą 30 °C temperatūroje atitinkamai per dvi ir tris dienas. 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, bandiniai yra imami tada, kai maišymo laikas nebeturi įtakos tiriamojo tirpalo koncentracijai.

Turėtų būti užrašomas kiekvieno bandinio 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 bandinių, 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 (tapatumas ir priemaišos),
- kiekvieno bandinio individualiosios koncentracijos, debitai ir pH,
- ne mažiau kaip penkių bandinių 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.

### 3.2. KOLBOS METODAS

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

- išankstinio bandymo rezultatai,
- išsamios medžiagos charakteristikos (tapatumas ir priemaišos),
- kiekvienas individualus nustatymas ir vidurkis, jeigu kiekvienai kolbai buvo nustatoma daugiau negu viena vertė,
- kiekvieno bandinio 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.

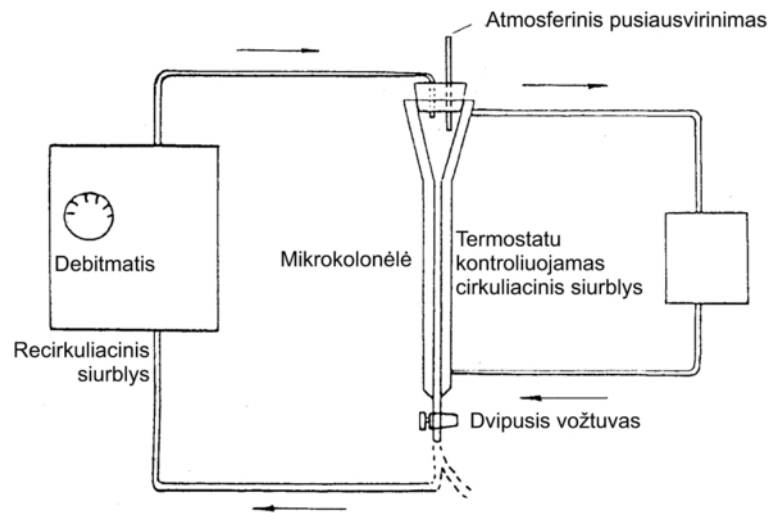
4. **NUORODOS**

- 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.

## PRIEDĖLIS

1 paveikslas

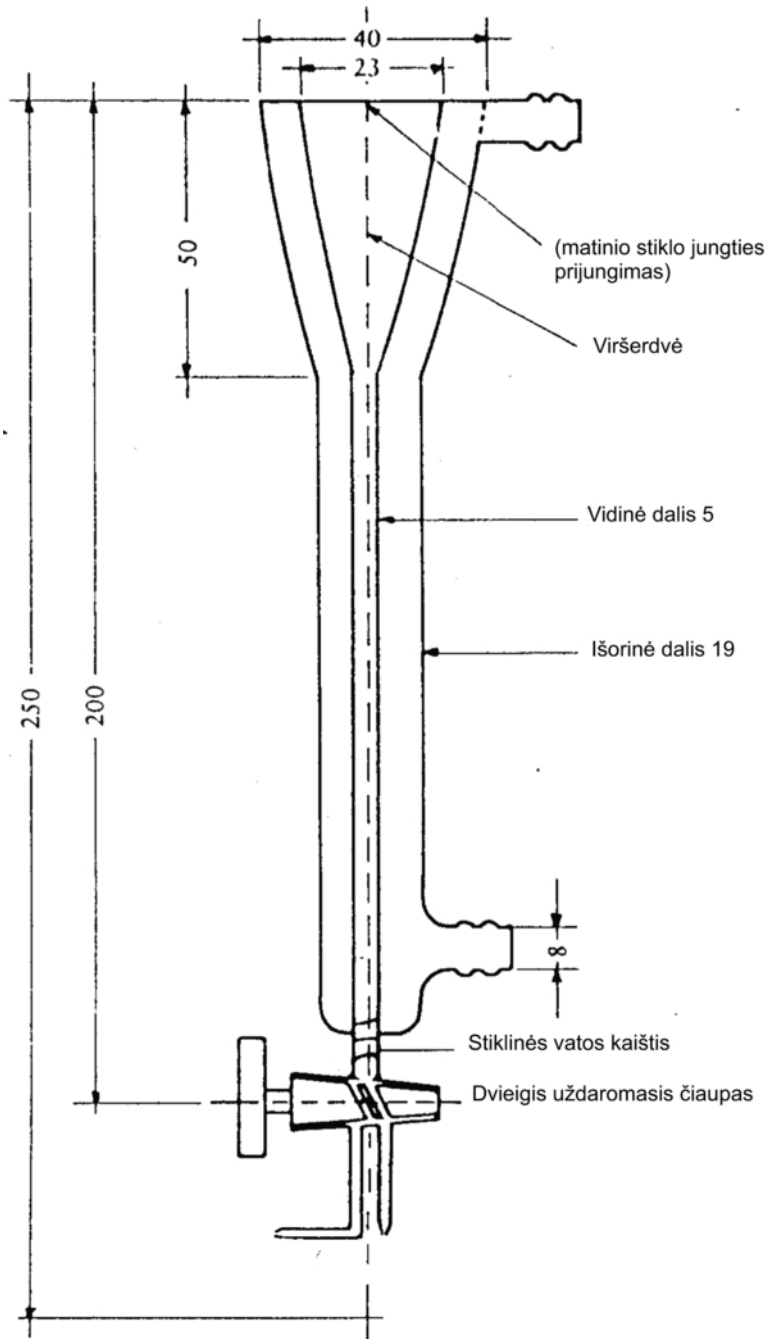
## Kolonėlės eliuavimo metodas su recirkuliaciniu siurbliu



2 paveikslas

## Tipiška mikrokolonėlė

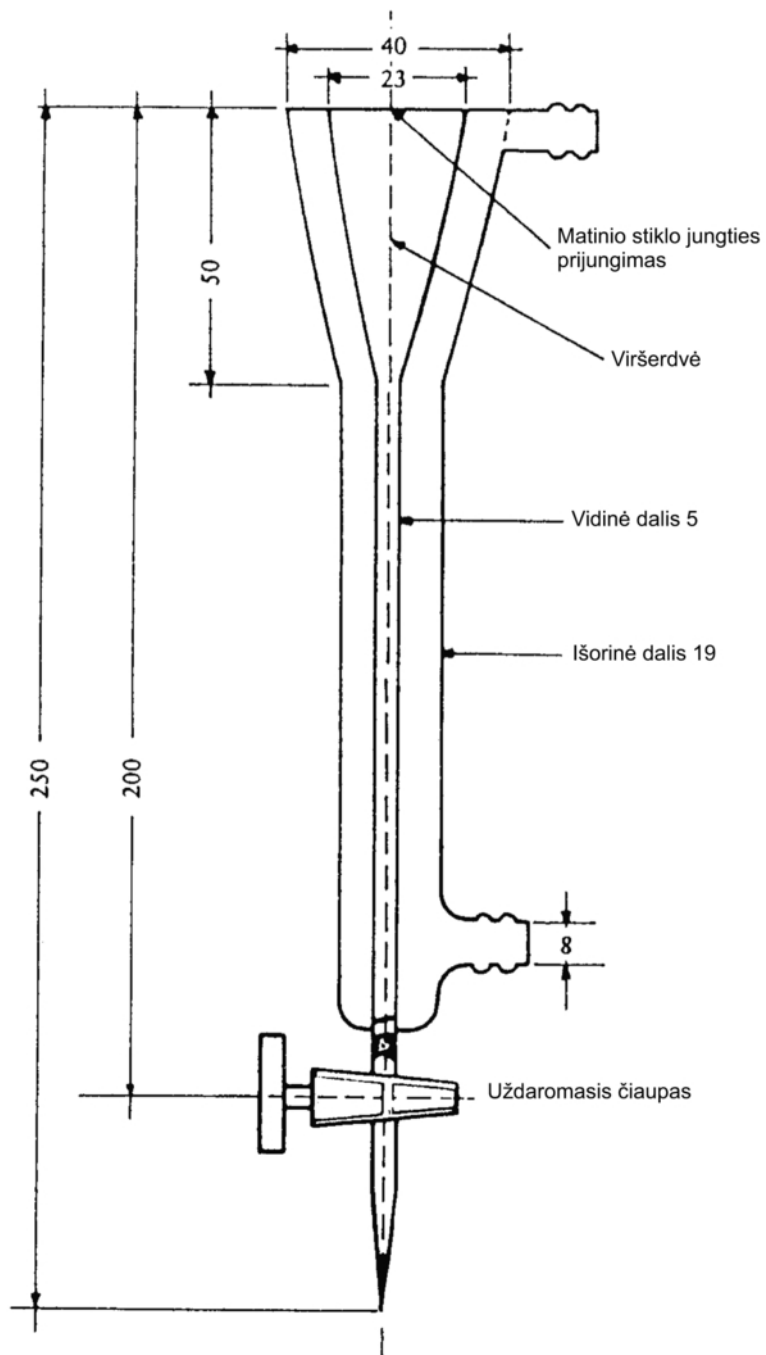
(Visi matmenys pateikti milimetrais)



3 paveikslas

## Tipiška mikrokolonėlė

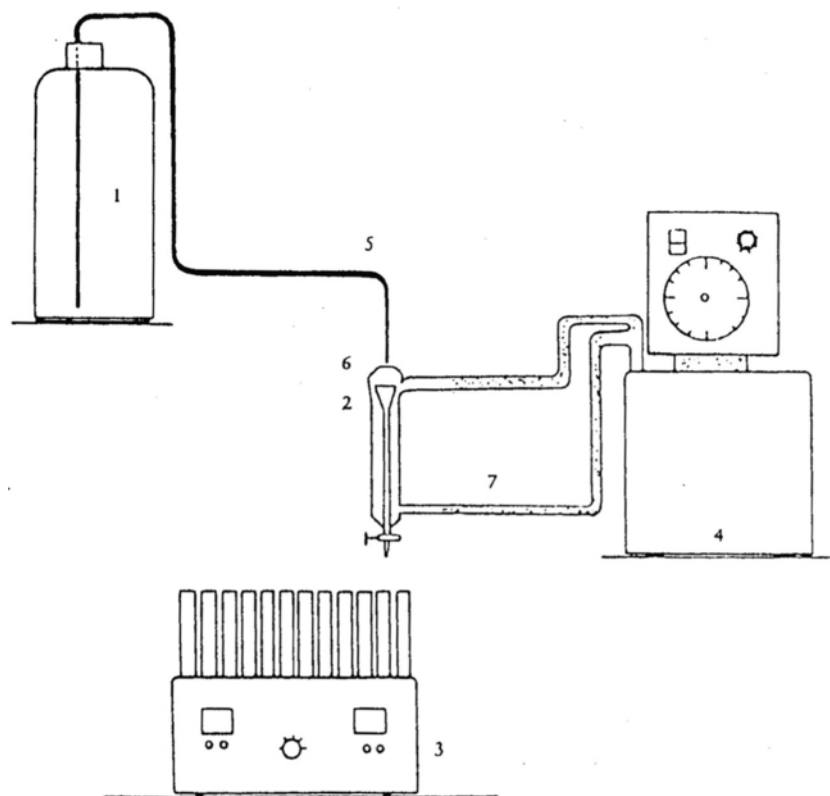
(Visi matmenys pateikti milimetrais)





## 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).

## A.7. PASISKIRSTYMO KOEFICIENTAS

## 1. METODAS

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

## 1.1. ĮVADAS

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

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

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

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

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

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

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

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

## 1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

*Kratomos kolbos metodas*

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

*HPLC metodas*

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

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

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

#### 1.4. METODO PRINCIPAS

##### 1.4.1. **Kratomos kolbos metodas**

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

##### 1.4.2. **HPLC metodas**

HPLC yra atliekama su analizinėmis kolonėlėmis, įkrautomis prekyboje esančiomis kietosiomis fazėmis su ilgomis angliavandenių grandinėmis (pvz.,  $C_8$ ,  $C_{18}$ ), chemiškai sujungtomis su kvarcu. Chemikalai, išvirkšti į tokią kolonėlę, juda išilgai jos skirtingais greičiais, kadangi pasiskirstymas tarp judančiosios būsenos ir angliavandens statinės būsenos yra skirtingo laipsnio. Chemikalų mišiniai dėl jų hidrofobiškumo yra pirma eliuojami vandenyje tirpiaisiais chemikalais, po to alyvoje tirpiaisiais 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 talpos faktoriaus  $k$ , gaunamo iš lygties:

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

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

Kiekybiniai analizės metodai nereikalingi, reikia tik nustatyti eliuavimo laiką.

#### 1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

##### 1.5.1. **Pakartojamumas**

*Kratomos kolbos metodas*

Norint užtikrinti pasiskirstymo koeficiento tikslumą, bandymas turi būti atliekamas du kartus, esant trimis 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 bandymai. 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 procedūros aptikimo ribą. Tai turėtų leisti įvertinti log  $P_{ow}$  vertes intervale nuo 2 iki 4 (kartais, kai to reikalauja tam tikros sąlygos, šis intervalas log  $P_{ow}$  gali būti išplečiamas iki 5), jeigu tirpinio koncentracija bet kokioje būsenoje nėra didesnė negu 0,01 molio viename litre.

### HPLC metodas

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

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

### 1.5.3. **Specifiškumas**

#### *Kratomos kolbos metodas*

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

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

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

### 1.6. METODO APIBŪDINIMAS

#### 1.6.1. **Išankstinis pasiskirstymo koeficiento įvertinimas**

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

#### 1.6.2. **Kratomos kolbos metodas**

##### 1.6.2.1. *Pasiruošimas*

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

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

##### *Pastaba*

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

##### 1.6.2.1.1. **Išankstinis tirpiklių sotinimas**

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

##### 1.6.2.1.2. **Pasiruošimas bandymui**

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

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

- mažiausias bandomos medžiagos kiekis, reikalingas analizei atlikti, ir
- didžiausios koncentracijos apribojimas bet kurioje fazėje 0,01 molio viename litre.

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

#### 1.6.2.1.3. Bandomoji medžiaga

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

#### 1.6.2.2. Bandymo sąlygos

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

#### 1.6.2.3. Matavimo eiga

##### 1.6.2.3.1. Pasiskirstymo pusiausvyros nustatymas

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

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

##### 1.6.2.3.2. Fazių atskyrimas

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

#### 1.6.2.4. Analizė

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

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

- fotometrinis metodas,
- dujų chromatografija,
- efektyvioji skysčių chromatografija.

**1.6.3. HPLC metodas****1.6.3.1. Pasiruošimas***Aparatūra*

Reikalingas skysčių chromatografas su įtaisytu impulsų nesukeliančiu siurbliu ir atitinkamu detektoriumi. Rekomenduojama naudoti injekcinį vožtuvą su injekcinėmis kilpomis. Tai, kad statinėje fazėje yra polinės grupės, gali smarkiai pakenkti HPLC kolonėlės darbiui. Todėl statinėse fazėse turėtų būti mažiausias procentas polinių grupių (11). Gali būti naudojamos parduodamos mikrodalelių atvirkštinių fazių įkrovos arba jau įkautos kolonėlės. Apsaugos kolonėlė gali būti dedama tarp išvirkštimo 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-oktanolėje yra mažas, turi polinkį mažoms log  $P_{ow}$  vertėms, kai naudojamas HPLC metodas; tokių junginių smailės kartais atsiranda įvykų tirpiklio frontui. Tai tikriausiai vyksta dėl to, kad pasiskirstymo procesas yra per lėtas pusiausvyrai pasiekti per normalų HPLC atskyrimo laiką. Tada debito mažinimas ir (arba) metanolio/vandens santykio mažinimas gali būti veiksminga priemonė patikimai vertei gauti.

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

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

*Tirpiniai*

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

*Bandymo sąlygos*

Matavimų metu temperatūra neturėtų svyruoti daugiau negu  $\pm 2$  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., tiokarbamidus arba formamidus). 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 a ir b regresijos lygties atidėjimas ir pasvirimas::

$$t_{r(nc+1)} = a + b t_{r(nc)}$$

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

#### *Kalibravimo grafikas*

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

#### *Bandinio talpos koeficiento nustatymas*

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

## 2. DUOMENYS

#### *Kratomos kolbos metodas*

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

## 3. ATASKAITOS PATEIKIMAS

Bandymo ataskaitoje, jeigu įmanoma, pateikiama tokia informacija:

- tikslus medžiagos apibūdinimas (tapatumas ir priemaišos),
- jeigu metodų neįmanoma panaudoti (pvz., paviršinio aktyvumo medžiaga), turėtų būti pateikiama apskaičiuotoji vertė arba duomenys, pagrįsti individualiu tirpumu n-oktanolyje ir vandenyje,
- visa informacija ir pastabos, svarbios duomenų aiškinimui, ypač atsižvelgiant į medžiagoje esančias priemaišas ir jos fizinę būseną.

#### *Kratomos kolbos metodei:*

- išankstinio įvertinimo, jei toks buvo, rezultatai,
- bandymo temperatūra,
- duomenys apie analizės procedūras, naudotas nustatant koncentracijas,
- centrifugavimo, jei jis buvo naudotas, laikas ir greitis,
- kiekvienam nustatymui matuotos koncentracijos abiejose fazėse (tai reiškia, kad ataskaitoje bus pateikta iš viso 12 koncentracijų),
- bandinio svoris, kiekvienos naudotos fazės tūris kiekviename mėgintuvėlyje ir visas apskaičiuotas mėginio kiekviename 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  $P_{ow}$ , jei ši vertė buvo nustatyta arba jeigu išmatuotoji vertė  $> 10^4$ ,
- naudoto vandens ir vandens fazės pH eksperimento metu,
- jeigu naudojami buferiniai tirpalai, buferių naudojimo vietoje vandens pagrindimas, buferinių tirpalų sudėtis, koncentracija ir pH, vandens fazės pH prieš eksperimentą ir po jo.

*HPLC metodui:*

- išankstinių vertinimų, jeigu tokie buvo, rezultatai,
- mėginiai ir etaloninės medžiagos, jų grynumas,
- nustatymo temperatūros intervalas,
- pH dydis, kuriam esant buvo atliekamas nustatymas,
- išsami informacija apie analizės ir apsauginę kolonėlę, judančiąją fazę ir nustatymo vidurkius,
- duomenys apie kalibravimui naudotų etaloninių junginių sulaikymo trukmes ir literatūroje randamas log P vertės
- išsami informacija apie regresijos kreivės sudarymą (log k santykis su log P),
- vidutiniai bandomo junginio duomenys apie sulaikymo trukmes ir interpoliuotą log P vertę,
- įrangos ir darbo sąlygų apibūdinimas,
- eliuavimo profiliai,
- į kolonėlę pakrautų mėginių ir etaloninių medžiagų kiekiai,
- nulinis laikas ir kaip jis buvo išmatuotas.

4. **NUORODOS**

- 1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 107, Decision of the Council C(81) 30 final.
- 2) C. Hansch and A.J. Leo, Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology, John Wiley, New York, 1979.
- 3) Log P and Parameter Database, A tool for the quantitative prediction of bioactivity (C. Hansch, chairman, A.J. Leo, dir.) – Available from Pomona College Medical Chemistry Project 1982, Pomona College, Claremont, California 91711.
- 4) L. Renberg, G. 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.
- 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.

## 1 priedėlis

## APSKAIČIAVIMO / VERTINIMO METODAI

## ĮVADAS

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

Apskaičiuotosios  $P_{ow}$  vertės gali būti naudojamos:

- spręsti apie eksperimentinių metodų tinkamumą (kratomos kolbos metodo intervalas:  $\log P_{ow}$  vertės nuo 2 iki 4, HPLC intervalas:  $\log P_{ow}$ : nuo 0 iki 6),
- bandymo tinkamoms sąlygoms parinkti (pvz., etalonines medžiagas HPLC metodikose, n-oktanolio ir vandens tūrių santykį kratomos kolbos metode),
- kaip galimų eksperimentinių paklaidų laboratorijos vidinės kontrolės priemonė,
- $P_{ow}$  gauti tais atvejais, kai eksperimentiniai metodai negali būti taikomi dėl techninių priežasčių.

## VERTINIMO METODAS

Išankstinis pasiskirstymo koeficiento įvertis

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

Taigi:

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

## APSKAIČIAVIMO METODAI

Apskaičiavimo metodų esmė

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

Dalių konstantų ir pataisus 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 pataisus dėmenų teisingo naudojimo (mažiau problemų turint kompiuterinę programą CLOGP-3) (b). Joninių junginių atveju svarbu teisingai įvertinti krūvį arba jonizacijos laipsnį.

## Apskaičiavimo procedūros

### Hansch $\pi$ -metodas

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

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

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

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

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

### Rekker metodas

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

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

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

### Kombinuotasis metodas

Sudėtinių molekulių  $\log P_{ow}$  apskaičiavimas gali būti iš esmės pagerintas, jei molekulė dalinama į didesnes struktūrinės dalis, kurių  $\log P_{ow}$  patikimos vertės randamos lentelėse (b), (c) arba gaunamos naudojant pačių atliktus matavimus. Vėliau tokie fragmentai (pvz., heterociklai, antrachinonas, azobenzenas) gali būti derinami su Hansch  $\pi$ -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.
- ii) Jei gali būti padaryta prielaida apie tarp molekulių 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 molekulių erdvinis 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, priemonės ir t. t.),
- kokio nors galimo intramolekulinio vandenilinio ryšio, disociacijos, krūvio ir visų kitų neįprastų veiksmų (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, Pharmacology 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.

## 2 Priedėlis

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

Nr.	Etaloninė medžiaga	Log P <sub>ow</sub>	pKa
1	2-butanonas	0,3	
2	4-acetilpiridinas	0,5	
3	Anilinas	0,9	
4	N-fenilacetamidas	1,0	
5	Benzilo alkoholis	1,1	
6	p-metoksifenolis	1,3	pKa = 10,26
7	Feniloksiacto rūgštis	1,4	pKa = 3,12
8	Fenolis	1,5	pKa = 9,92
9	2,4-dinitrofenolis	1,5	pKa = 3,96
10	Benznitrilas	1,6	
11	Fenilacetonitrilas	1,6	
12	4-metilbenzilo alkoholis	1,6	
13	Acetofenonas	1,7	
14	2-nitrofenolis	1,8	pKa = 7,17
15	3-nitrobenzenkarboninė rūgštis	1,8	pKa = 3,47
16	4-chloranilinas	1,8	pKa = 4,15
17	Nitrobenzenas	1,9	
18	3-fenilpropen-2-olis	1,9	
19	Benzenkarboninė rūgštis	1,9	pKa = 4,19
20	p-krezolis	1,9	pKa = 10,17
21	3-fenilakrilo rūgštis	2,1	pKa = 3,89 cis 4,44 trans
22	Anizolas	2,1	
23	Metilbenzoatas	2,1	
24	Benzenas	2,1	
25	3-metilbenzenkarboninė rūgštis	2,4	pKa = 4,27
26	4-chlorfenolis	2,4	pKa = 9,1
27	Trichloretilenas	2,4	
28	Atrazinas	2,6	
29	Etilbenzoatas	2,6	
30	2,6-dichlorbenznitrilas	2,6	
31	3-chlorbenzenkarboninė rūgštis	2,7	pKa = 3,82
32	Toluenas	2,7	
33	1-naftolis	2,7	pKa = 9,34
34	2,3-dichloranilinas	2,8	
35	Chlorbenzenas	2,8	
36	Alilfenileteris	2,9	
37	Brombenzenas	3,0	
38	Etilbenzenas	3,2	
39	Benzofenonas	3,2	
40	4-fenilfenolis	3,2	pKa = 9,54
41	Timolis	3,3	

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

A.8. **PLIŪPSNIO TEMPERATŪRA**1. **METODAS**1.1. **ĮVADAS**

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

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

1.2. **APIBRĖŽTYS IR VIENETAI**

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

Vienetai: °C;

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

(t nurodoma oC, T nurodoma K).

1.3. **ETALONINĖS MEDŽIAGOS**

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

1.4. **METODO PRINCIPAS**

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

1.5. **KOKYBĖS KRITERIJAI**1.5.1. **Pakartojamumas**

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

1.5.2. **Jautrumas**

Jautrumas priklauso nuo taikyto bandymo metodo.

1.5.3. **Specifiškumas**

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

1.6. **METODO APRAŠYMAS**1.6.1. **Pasiruošimas**

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

Saugai užtikrinti rekomenduojama, kad intensyviai reaguojančių ir nuodingų medžiagų bandinys būtų mažas, maždaug 2 cm<sup>3</sup>.

**1.6.2. Bandymo sąlygos**

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

**1.6.3. Bandymo eiga****1.6.3.1. Pusiausvyrinis metodas**

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

**1.6.3.2. Nepusiausvyrinis metodas**

*Abel aparatas:*

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

*Abel-Pensky aparatas:*

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

*Tag aparatas:*

žr. ASTM D 56.

*Pensky-Martens aparatas:*

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

*Pastabos:*

Kai nepusiausvyrininiu metodu pagal 1.6.3.2 nustatoma, kad pliūpsnio temperatūra lygi  $0 \pm 2$  °C,  $21 \pm 2$  °C arba  $55 \pm 2$  °C, jos vertė turi būti patvirtinta pusiausvyrininiu metodu, naudojant tą patį aparatą.

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

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

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

**2. DUOMENYS****3. ATASKAITA**

Jei įmanoma, bandymo ataskaitoje turi būti tokia informacija:

- tiksli medžiagos specifikacija (tapatumas ir priemaišos),
- turi būti nurodytas taikytas metodas, taip pat visi galimi nukrypimai,
- rezultatai ir visos papildomos pastabos, kurios būtų svarbios aiškinant rezultatus.

**4. NUORODOS**

Nėra



## A.9. DEGUMAS (KIETOSIOS MEDŽIAGOS)

## 1. METODAS

## 1.1. ĮVADAS

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

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

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

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

## 1.2. APIBRĖŽTYS IR VIENETAI

Degimo laikas išreiškiamas sekundėmis.

## 1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Nenurodytos.

## 1.4. METODO PRINCIPAS

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

## 1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

Nenurodyti.

## 1.6. METODO APRAŠYMAS

## 1.6.1. Išankstinis atrankos bandymas

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

## 1.6.2. Degimo greičio nustatymo bandymas

## 1.6.2.1. Pasiruošimas

Medžiagos milteliai arba granulės suberiamos į 250 mm ilgio formą, turinčią trikampio formos skerspjūvį, kurio vidinis aukštis 10 mm ir plotis 20 mm. Abejose formos pusėse išilgine kryptimi tvirtinamos dvi iš šonų ribojančios metalinės plokštės, kurios yra 2 mm aukštesnės nei viršutinis trikampio skerspjūvio kraštas (žr. paveikslą).

Forma tris kartus numetama iš 2 cm aukščio ant kieto paviršiaus. Jei reikia, forma vėl pripildoma. Šoninės ribojančios plokštės nuimamos ir medžiagos perteklius nubraukiamas. Ant formos viršaus uždedama nedegi, neaktyvi ir blogai šilumą leidžianti pagrindo plokštė, įtaisas apverčiamas ir forma nuimama.

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

#### 1.6.2.2. *Bandymų sąlygos*

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

#### 1.6.2.3. *Bandymo eiga*

Bandinys dedamas į traukos spintą skersai traukos kryptčiai.

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

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

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

## 2. **DUOMENYS**

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

## 3. **ATASKAITA**

### 3.1. **BANDYMŲ ATASKAITA**

Jei įmanoma, bandymų ataskaitoje turi būti tokia informacija:

- tiksli medžiagos specifikacija (tapatumas ir priemaišos),
- bandomosios medžiagos apibūdinimas, jos fizinė būsena, įskaitant drėgmės kiekį,
- išankstinių atrankos bandymų ir degimo greičio bandymo, jei buvo atliekamas, rezultatai,
- visos papildomos pastabos, kurios būtų svarbios aiškinant rezultatus.

### 3.2. **REZULTATŲ AIŠKINIMAS**

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

## 4. **NUORODOS**

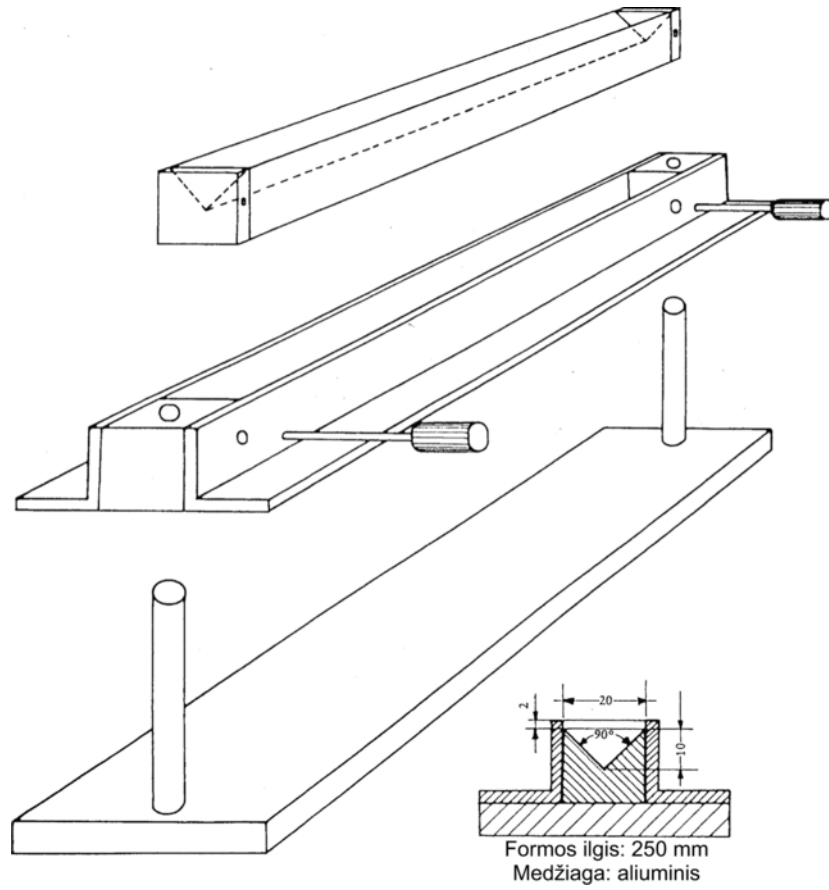
NF T 20–042 (September 85). Chemical products for industrial use. Determination of the flammability of solids.

Priedėlis

Paveikslas

**Forma ir priedai bandiniui paruošti**

(Visi matmenys milimetrais)



## A.10. DEGUMAS (DUJOS)

## 1. METODAS

## 1.1. ĮVADAS

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

## 1.2. APIBRĖŽTIS IR VIENETAI

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

## 1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Nenurodytos.

## 1.4. METODO PRINCIPAS

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

## 1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

Neapibrėžti.

## 1.6. METODO APRAŠYMAS

## 1.6.1. Aparatūra

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

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

## 1.6.2. Bandymo sąlygos

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

## 1.6.3. Bandymo eiga

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

Jei cheminė dujų sandara rodo, kad jos neturėtų būti degios, ir gali būti apskaičiuota jų 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 (tapatumas ir priemaišos),
- naudotos aparatūros aprašymas, nurodant matmenis,
- temperatūra, kurioje bandymas buvo atliekamas,
- tirtos koncentracijos ir gauti rezultatai,
- bandymo rezultatas: nedegios dujos ar labai degios dujos,
- jei padaryta išvada, kad dujos nedegios, tai turi būti nurodytas koncentracijos intervalas, kuriame tai buvo daroma 1 % pakopomis,
- turi būti pateikta visa rezultatams aiškinti reikalinga informacija ir pastabos.

**4. NUORODOS**

- 1) NF T 20-041 (SEPT 85). Chemical products for industrial use. Determination of the flammability of gases.
- 2) W. Berthold, D. Conrad, T. Grewer, H. Grosse- einer Standard-Apparatur zur Messung von Explosionsgrenzen'. Chem.-Ing.- Tech. 1984, vol. 56, 2, p. 126-127. Wortmann, T. Redeker und H. Schacke. 'Entwicklung

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

## 1. METODAS

## 1.1. ĮVADAS

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

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

## 1.2. APIBRĖŽTYS IR VIENETAI

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

## 1.3. METODO PRINCIPAS

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

## 1.3.1. 1 pakopa

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

## 1.3.2. 2 pakopa

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

## 1.3.3. 3 pakopa

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

## 1.3.4. 4 pakopa

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

## 1.4. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Nenurodytos.

## 1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

1.6. METODO APRAŠYMAS

1.6.1. **1 pakopa**

1.6.1.1. *Bandymo sąlygos*

Bandymas atliekamas kambario temperatūroje (maždaug 20 °C).

1.6.1.2. *Bandymo eiga*

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

1.6.2. **2 pakopa**

1.6.2.1. *Aparatūra*

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

1.6.2.2. *Bandymo sąlygos*

Bandymas atliekamas kambario temperatūroje (maždaug 20 °C).

1.6.2.3. *Bandymo eiga*

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

1.6.3. **3 pakopa**

1.6.3.1. *Bandymo sąlygos*

Bandymas atliekamas kambario temperatūroje (maždaug 20 °C).

1.6.3.2. *Bandymo eiga*

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

1.6.4. **4 pakopa**

1.6.4.1. *Aparatūra*

Surenkamas paveiksle parodytas aparatas.

1.6.4.2. *Bandymo sąlygos*

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

#### 1.6.4.3. *Bandymo eiga*

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

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

## 2. **DUOMENYS**

Medžiaga laikoma pavojinga, jei:

- bet kurioje bandymo pakopoje įvyksta užsidegimas,
- arba
- degios dujos skiriasi didesne kaip 1 litras/kg bandomosios medžiagos per valandą sparta.

## 3. **ATASKAITA**

Bandymų ataskaitoje, jei įmanoma, turi būti tokia informacija:

- tiksli medžiagos specifikacija (tapatumas ir priemaišos),
- bet kokio bandomosios medžiagos pradinio ruošimo detalės,
- 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**

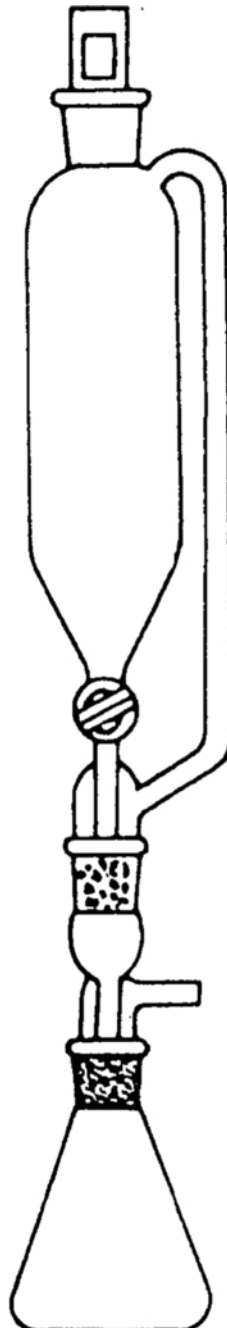
- 1) Recommendations on the transport of dangerous goods, test and criteria, 1990, United Nations, New York.
- 2) NF T 20–040 (September 85). Chemical products for industrial use. Determination of the flammability of gases formed by the hydrolysis of solid and liquid products.



*Priedėlis*

*Paveikslas*

**Aparatas**



## A.12. PIROFORINĖS KIEŲJŲ MEDŲIAGŲ IR SKYSŲIŲ SAVYBĖS

## 1. METODAS

## 1.1. ĮVADAS

Bandymo metodikos taikytinos kietosioms ir skystosioms medŲiagoms, kurių maŲi kiekiai savaime užsidega po trumpalaikio sąlyŲio su oru kambario temperatūroje (maŲdaug 20 °C).

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

## 1.2. APIBRĖŲTYS IR VIENETAI

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

Savaiminių skysŲių užsiliepsnojimą gali tekti tirti taikant A.15 metodą „SkysŲių ir dujų savaiminio užsiliepsnojimo temperatūra“.

## 1.3. ETALONINĖS MEDŲIAGOS

Nenurodytos.

## 1.4. METODO PRINCIPAS

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

## 1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

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

## 1.6. BANDYMŲ METODO APRAŠYMAS

## 1.6.1. Aparatūra

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

Pastaba

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

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

## 1.6.2. Bandymo eiga

## a) Kietųjų medŲiagų milteliai

1–2 cm<sup>3</sup> bandomosios kietos medŲiagos miltelių iš maŲdaug 1 m aukščio beriama ant nedegaus paviršiaus ir žiūrima, ar medŲiaga užsidega krisdama arba per penkias minutes po nusėdimo.

Bandymas kartojamas šešis kartus, jei medžiaga neužsidega anksčiau.

b) *Skysčiai*

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

Jei per šešis bandymus medžiaga neužsidega, daromi tokie bandymai:

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

2. **DUOMENYS**

2.1. REZULTATŲ APDOROJIMAS

Bandymas gali būti nutrauktas, gavus pirmą teigiamą rezultatą.

2.2. VERTINIMAS

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

3. **ATASKAITA**

Bandymų ataskaitoje, jei įmanoma, turi būti tokia informacija:

- tiksli medžiagos specifikacija (tapatumas ir 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.

## A.13. SPROGUMAS

## 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 duomenys 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 naudojant nurodytą aparatūrą.

Bandymų atlikti nereikia, kai turima informacija apie medžiagos termodinaminės 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. APIBRĖŽTYS IR VIENETAI

Sprogstamosios medžiagos:

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

## 1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

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

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

## 1.4. METODO PRINCIPAS

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

## 1.4.1. Saugaus naudojimo bandymai (3)

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

**1.4.2. Terminis jautrumas**

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

**1.4.3. Mechaninis jautrumas (smūgis)**

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

**1.4.4. Mechaninis jautrumas (trintis)**

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

**1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI**

Nenurodyti.

**1.6. METODO APRAŠYMAS****1.6.1. Terminis jautrumas (liepsnos poveikis)****1.6.1.1. Aparatūra**

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

**1.6.1.2. Bandymų sąlygos**

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

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

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

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

### 1.6.1.3. *Bandymų eiga*

Kiekvienas bandymas atliekamas tol, kol vamzdis sutrūkinėja į dalis, arba jis kaitinamas penkias minutes. Vertinama, kad bandymo metu įvyko 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.

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

### 1.6.1.4. *Vertinimas*

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

## 1.6.2. **Mechaninis jautrumas (smūgis)**

### 1.6.2.1. *Aparatūra (4 paveikslas)*

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

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

### 1.6.2.2. *Bandymų sąlygos*

Bandinio tūris turi būti lygus 40 mm<sup>3</sup>, arba tūris turi atitikti bet kokį alternatyvųjį aparatą. Kietos medžiagos turi būti išbandytos sausas ir ruošiamos taip:

- milteliai sijojami (sieto akučių dydis 0,5 mm); bandymui naudojama visa tai, kas išbyra per sieta;
- presuotos, lietos ar kitu būdu tankintos medžiagos smulkinamos į mažus gabaliukus ir sijojamos; bandymui naudojamos sijotos 0,5–1 mm skersmens frakcijos, kurios turi sudaryti reprezentatyvią pradinės medžiagos dalį.

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

### 1.6.2.3. *Bandymų eiga*

Atliekama šešių bandymų serija, metant 10 kg masės svarstį iš 0,40 m aukščio (40 J). Jei 40 J atveju šešių bandymų metu sproginimas 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 sproginimas (liepsnos blyksniai ir (arba) garsas, prilygstantis sproginimo 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, ekscentrinio krumpliaračiu ir atitinkama pavara tokiu būdu, kad porcelianinė plokštė po porcelianiniu kaiščiu pajudinama tik kartą 10 mm į priekį ir atgal. Porcelianinį kaištį galima apkrauti, pvz., 120 arba 360 N apkrova.

Plokščios porcelianinės plokštės pagamintos iš balto techninio porceliano (šiurkštumas nuo 9 iki 32  $\mu\text{m}$ ), 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. Bandymo sąlygos

Bandinio tūris turi būti lygus 10 mm<sup>3</sup> arba toks, kad tiktų bet kuriam alternatyviam aparatui.

Kietos medžiagos išbandomos sausos ir ruošiamos taip:

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

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

#### 1.6.3.3. Bandymų eiga

Porcelianinis kaištis uždedamas ant bandomosios medžiagos ir veikiamas apkrova. Atliekant bandymą porceliano plokštės akytumo žymės turi būti skersai judėjimo krypties. Kaištis turi būti ant bandinio, po kaiščiu turi būti pakankamas kiekis bandinio medžiagos ir plokštė po kaiščiu turi judėti teisingai. Plokštelę padengti pastos pavidalo medžiaga naudojamas 0,5 mm storio laikiklis, turintis 2  $\times$  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 sprogimas (prilygstantis sprogimui traškesys ir (arba) sprogimą primenantis garsas arba liepsnos blyksnis) arba jei jie atitinka lygiavėčius kriterijus vykdant alternatyvų trinties bandymą.

## 2. DUOMENYS

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

### 3. ATASKAITA

#### 3.1. BANDYMŲ ATASKAITA

Bandymų ataskaitoje, jei įmanoma, turi būti tokia informacija:

- bandomosios medžiagos tapatumas, sudėtis, grynumas, drėgmės kiekis ir t. t.,
- bandinio fizinė forma ir ar jis buvo smulkinamas, trupinamas ir (arba) sijojamas,
- stebėjimai vykdant terminio jautrumo bandymus (pvz., bandinio masė, skeveldrų skaičius ir t. t.),
- stebėjimai vykdant mechaninio jautrumo bandymus (pvz., didelio dūmų kiekio susidarymas arba visiškas medžiagos irimas be garso, liepsnos, kibirkščių, traškesio ir t. t.),
- kiekvieno tipo bandymų rezultatai,
- jei buvo naudojamas alternatyvus aparatas, turi būti pateiktas mokslinis pagrindimas, taip pat duomenys apie koreliaciją tarp rezultatų, gautų nustatytu aparatu, ir rezultatų, gautų lygiaverčiu aparatu,
- visi naudingi komentarai, pvz., nuoroda į panašių medžiagų bandymus, kurie galbūt tiktų tinkamai paaiškinti rezultatus,
- visos papildomos pastabos, kurios būtų svarbios aiškinant rezultatus.

#### 3.2. REZULTATŲ AIŠKINIMAS IR VERTINIMAS

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

### 4. NUORODOS

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



## Priedėlis

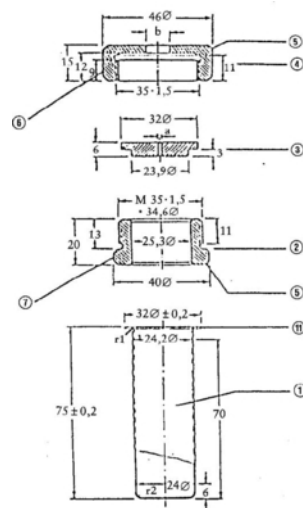
## Terminio jautrumo bandyme naudojamų medžiagų specifikacijos pavyzdys (žr. DIN 1623)

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

## 1 paveikslas

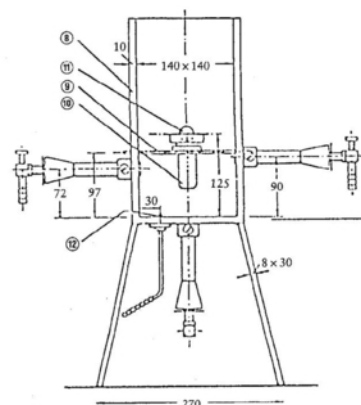
## Terminio jautrumo bandymo aparatas

(visi matmenys milimetrais)



1a pav. Plieninis 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

2 paveikslas

**Terminio jautrumo bandymas**

(skeveldrų susidarymo pavyzdžiai)



Sprogimas neįvyko



Sprogimas neįvyko



Sprogimas



Sprogimas



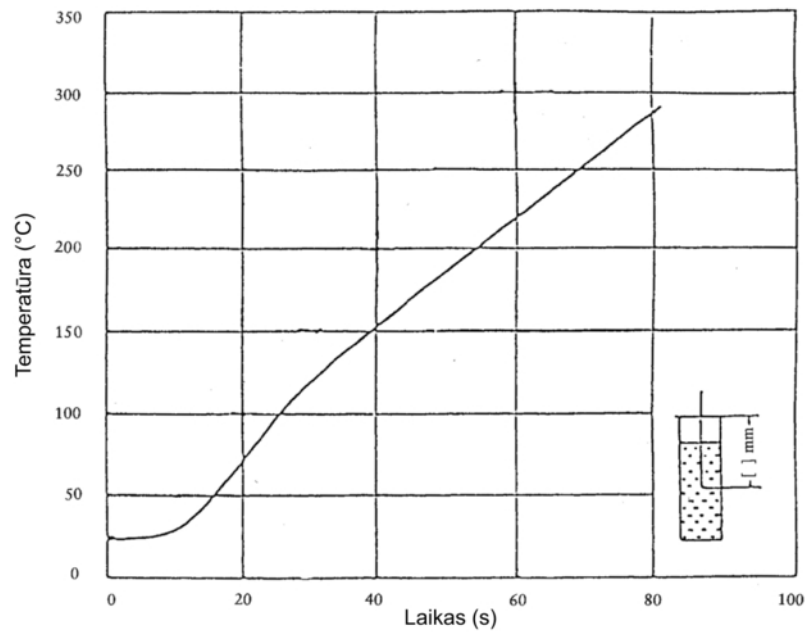
Sprogimas



Sprogimas

## 3 paveikslas

## Kaitinimo spartos kalibravimas terminio jautrumo bandymui

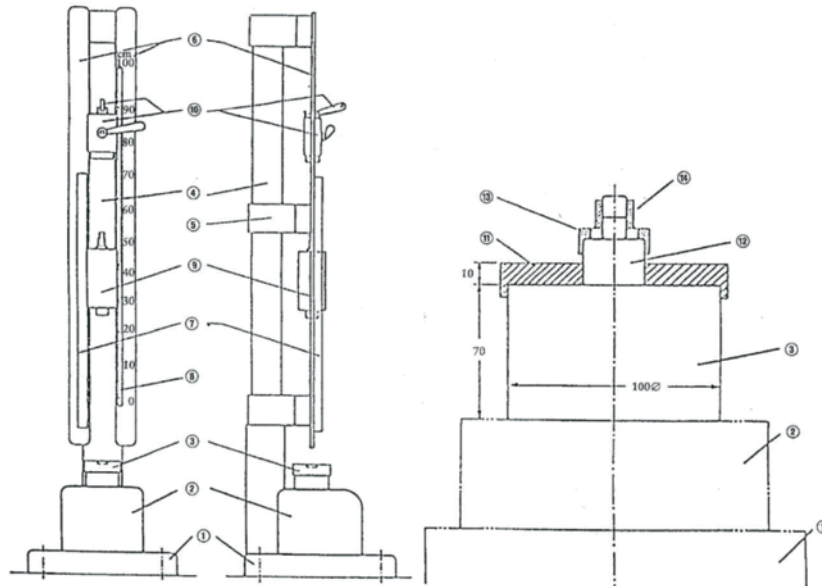


Temperatūros ir laiko priklausomybės kreivė gauta kaitinant dibutilfitalą ( $27 \text{ cm}^3$ ) uždare (1,5 mm diafragma) vamzdyje, naudojant 3,2 litro per minutę propano srautą. Temperatūra matuota 1 mm skersmens chromelio/aliumelio termoelementu, įdėtu į apvaskalą iš nerūdijančio plieno ir įstatytu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

## 4 paveikslas

## Jautrumo smūgiui bandymo aparatas

(visi matmenys milimetrais)



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

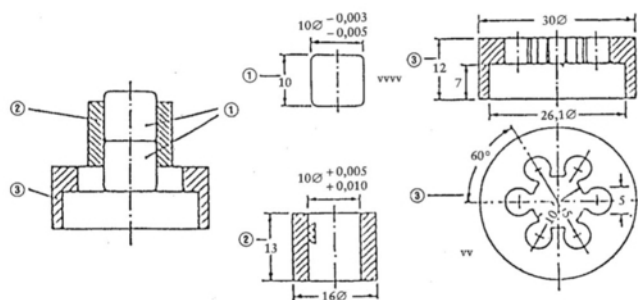
- (1) pagrindas, 450 × 450 × 60
- (2) plieninis blokas, 230 × 250 × 200
- (3) priekalas, 100 skersmuo × 70
- (4) kolona
- (5) vidurinioji skersė
- (6) 2 kreipikliai
- (7) krumplinis stovas

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

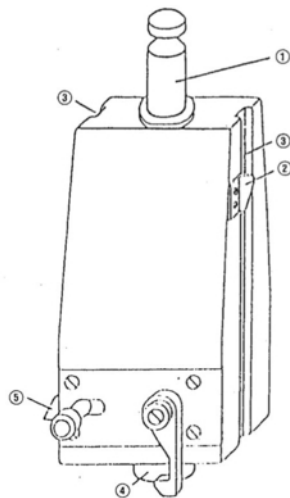
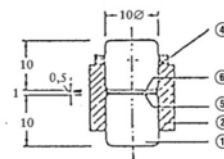
4 paveikslas

tęsinys



4c pav. Smūgiavimo įtaisas miltelių arba pastos pavidalo medžiagoms

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

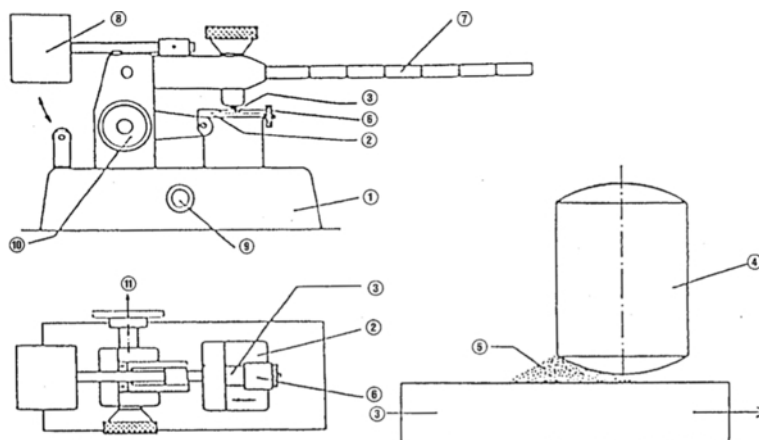


4e pav. Kūjis (kūjo masė 5 kg)

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

## 5 paveikslas

## Jautrumo trinčiai bandymo aparatas



5a pav. Trinties aparatas, vertikalusis ir horizontalusis vaizdas

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

5b pav. Kaiščio ant bandinio pradinė padėtis

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

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

## 1. METODAS

## 1.1. ĮVADAS

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

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

## 1.2. APIBRĖŽTYS IR VIENETAI

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

## 1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

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

## 1.4. METODO PRINCIPAS

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

## 1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

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

Jautrumas ir specifiškumas priklauso nuo taikyto bandymo metodo.

## 1.6. METODO APRAŠYMAS

## 1.6.1. Aparatūra

Aparatas aprašytas 1.6.3 nurodytame metode.

## 1.6.2. Bandymo sąlygos

Tiriamosios medžiagos bandinys yra tiriamas pagal 1.6.3 nurodytą metodą.

## 1.6.3. Bandymo eiga

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

## 2. DUOMENYS

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

**3. ATASKAITA**

Jei įmanoma, bandymų ataskaitoje turi būti tokia informacija:

- tiksli medžiagos specifikacija (tapatumas ir priemaišos),
- naudotas bandinio kiekis, atmosferos slėgis,
- naudota aparatūra,
- matavimų rezultatai (bandymų temperatūra, su savaiminiu užsiliepsnojimu susiję rezultatai, atitinkamų vėlinimų trukmė),
- visos papildomos pastabos, kurios būtų svarbios aiškinant rezultatus.

**4. NUORODOS**

Nėra.



**A.15. KIETŪJŲ MEDŽIAGŲ SANTYKINĖ SAVAIMINIO UŽSILIEPSNOJIMO TEMPERATŪRA****1. METODAS****1.1. ĮVADAS**

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

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

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

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

**1.2. APIBRĖŽTYS IR VIENETAI**

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

**1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS**

Nenurodytos.

**1.4. METODO PRINCIPAS**

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

**1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI**

Nėra.

**1.6. METODO APRAŠYMAS****1.6.1. Aparatūra****1.6.1.1. Krosnis**

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

**1.6.1.2. Kubas iš vielos tinklelio**

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

### 1.6.1.3. *Termoelementai*

Tinkami termoelementai.

### 1.6.1.4. *Savirašis*

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

### 1.6.2. **Bandymo sąlygos**

Medžiagos bandomos tokios, kokios yra gaunamos.

### 1.6.3. **Bandymo eiga**

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

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

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

## 2. **DUOMENYS**

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

## 3. **ATASKAITA**

Jei įmanoma, ataskaitoje turi būti tokia informacija:

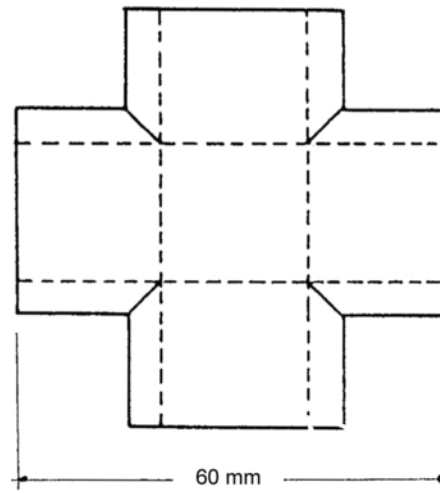
- tiriamosios medžiagos apibūdinimas,
- matavimo rezultatai, įskaitant temperatūros kitimo laike kreivę,
- visos papildomos pastabos, kurios būtų svarbios aiškinant rezultatus.

## 4. **NUORODOS**

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

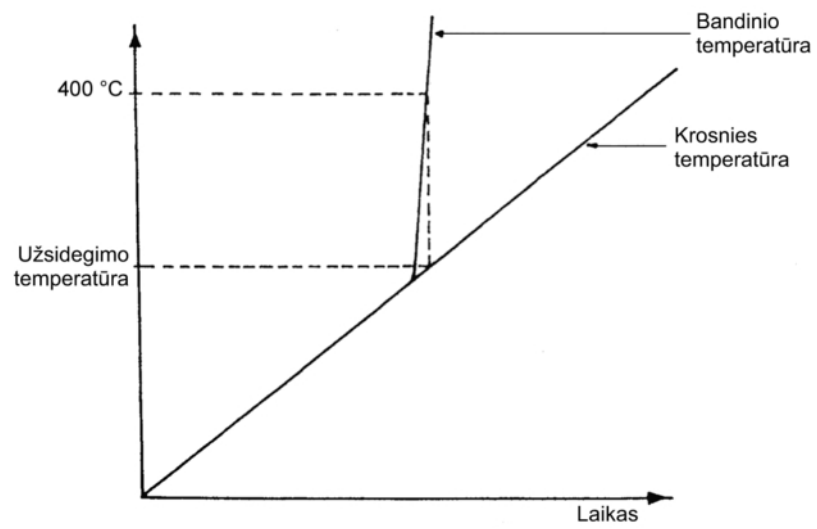
1 paveikslas

20 mm bandymo kubo pavyzdys



2 paveikslas

Tipinė temperatūros kitimo laike kreivė



## A.16. OKSIDACINĖS SAVYBĖS (KIETOSIOS MEDŽIAGOS)

## 1. METODAS

## 1.1. ĮVADAS

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

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

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

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

## 1.2. APIBRĖŽTIS IR VIENETAI

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

Degimo greitis: išreikštas milimetrais per sekundę.

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

## 1.3. ETALONINĖ MEDŽIAGA

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

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

## 1.4. METODO PRINCIPAS

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

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

## 1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

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

## 1.6. METODO APRAŠYMAS

## 1.6.1. Paruošimas

## 1.6.1.1. Bandomoji medžiaga

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

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

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

#### 1.6.1.2. *Degioji medžiaga*

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

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

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

#### 1.6.1.3. *Padegimo šaltinis*

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

### 1.6.2. **Bandymo eiga**

#### *Pastaba*

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

#### 1.6.2.1. *Išankstinis bandymas*

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

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 abejonų, 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, kraštiniais atvejais turi būti naudojami tarpinės sudėties oksidatoriaus ir celiuliozės mišiniai.

Krūvelėi paruošti naudojama forma. Iš metalo pagaminta forma yra 250 mm ilgio, o jos skerspjūvis yra trikampis, kurio vidinis aukštis 10 mm ir vidinis ilgis 20 mm. Abejose formos pusėse išilgine kryptimi tvirtinamos dvi šoninės metalinės plokštės, kurios yra 2 mm aukštesnės nei viršutinis trikampio skerspjūvio kraštas (žr. paveikslą). Šis įtaisas pripildomas mišinio, jo neplakant ir įpilant nedidelį perteklių. Forma vieną kartą numetama iš

2 cm aukščio ant kieto paviršiaus, o medžiagos perteklius nubraukiamas įstrižai pasukta plokšte. Šoninės plokštės nuimamos ir likę milteliai lyginami velenėliu. Po to, ant formos viršaus uždedama nedegi, neaktyvi ir blogai šilumą praleidžianti pagrindo plokštė, įtaisas apverčiamas ir forma nuimama.

Krūvelė dedama į traukos spintą skersai traukos krypčiai.

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

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

Vieną krūvelės galą padekite, prikišę prie jo liepsną.

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

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

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

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 didžiausią degimo greičio vertę.

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

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

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

## 3. ATASKAITA

### 3.1. BANDYMŲ ATASKAITA

Jei įmanoma, bandymų ataskaitoje turi būti tokia informacija:

- bandomosios medžiagos tapatumas, sudėtis, grynumas, drėgmės kiekis ir t. t.,
- kiekvienas bandinio apdorojimo būdas (pvz., malimas, džiovinimas),

- bandymuose naudotas uždegimo šaltinis,
- matavimų rezultatai,
- reakcijos pobūdis (pvz., degimas pliūpsniais paviršiuje, degimas visoje bandinio masėje, visa informacija apie degimo produktus ir t. t.),
- visos papildomos pastabos, kurios būtų svarbios aiškinant rezultatus, įskaitant degimo intensyvumo aprašymą (liepsnojimas, kibirkščiavimas, rūkimas, lėtas rusenimas ir t. t.) ir 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.

### 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

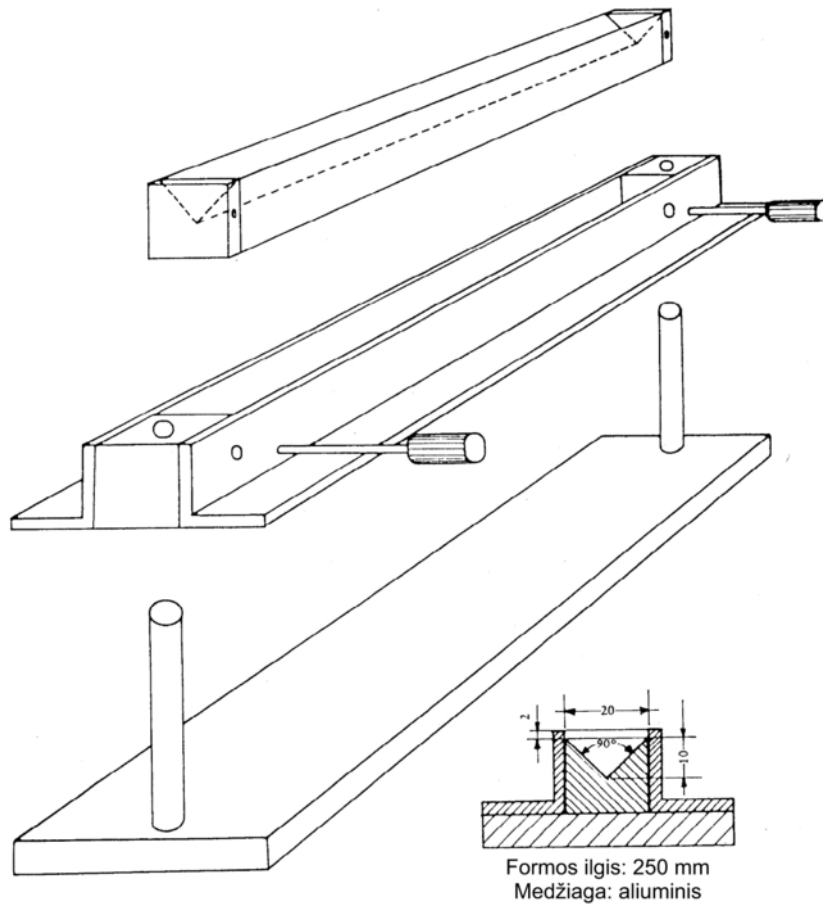
NF T 20–035 (SEPT 85). Chemical products for industrial use. Determination of the oxidizing properties of solids.

Priedėlis

Paveikslas

**Bandiniui ruošti naudojama forma ir priedai**

(visi matmenys milimetrais)





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

1. **METODAS**

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

1.1. **ĮVADAS**

Kadangi polimerų savybės yra labai skirtingos, neįmanoma aprašyti vieną atskirą metodą tiksliai nustatanti 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 taikytos 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 ilgą šakotą grandinę polimerams.

1.2. **APIBRĖŽTYS IR VIENETAI**

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

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

čia:

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

$M_i$  sulaikymo tūrį  $V_i$  atitinkančios polimero frakcijos molekulinė masė ir

$n$  yra duomenų taškų skaičius.

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

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

#### 1.4. BANDYMO METODO PRINCIPAS

Bandinio molekulinės masės skirstinys ir vidutinės molekulinės masės ( $M_n$ ,  $M_w$ ) gali būti nustatyti taikant GPC. GPC yra specialus skysčių chromatografijos metodas, kuriame bandinys atskiriamas pagal atskirų komponentų hidrodinaminį tūrį (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 žinomas molekulinės masės polimerus, geriausiai – panašios sandaros polimerus, pvz., įvairius polistireno etalonus. Vertikaliojoje ašyje žymint įvairios molekulinės masės išplautų dalelių kiekį, kuris reiškiamas mase, o horizontaliojoje ašyje – molekulinės masės logaritmą, dažniausiai gaunama Gauso kreivė, kartais su iškreipta nedidele uodega mažos molekulinės masės pusėje.

#### 1.5. KOKYBĖS KERITERIJAI

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

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

( $M_p$  yra etalono molekulinė masė, atitinkanti smailės viršūnę)

#### 1.6. BANDYMO METODO APRAŠYMAS

##### 1.6.1. Etaloninių polistireno tirpalų ruošimas

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

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

##### 1.6.2. Bandinio tirpalo ruošimas

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

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

**1.6.3. Aparatūra**

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

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

**1.6.4. Išvirkštymas ir tirpiklio tiekimo sistema**

Tam tikras bandinio tirpalo tūris griežtai nustatytoje zonoje įleidžiamas į kolonėlę, naudojant automatinę bandinio tiektuvą arba rankiniu būdu. Švirkšto stūmoklio per greitas ištraukimas arba spaudimas įleidžiant rankiniu būdu gali būti molekulių masių stebimo pasiskirstymo pokyčių priežastimi. Kiek įmanoma, tirpiklio tiekimo sistema turi būti be pulsacijų, geriausia 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 atskirimo 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 apskaičiuojamas 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 viršūnė atitinkantis eliuavimo tūris
- 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:

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

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:

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

čia:

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

$W_1, W_2$  = smailių pločiai pagrindo linijoje,

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

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

### 1.6.8. Tirpikliai

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

### 1.6.9. Temperatūros reguliavimas

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

### 1.6.10. Detektorius

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

## 2. DUOMENYS IR ATASKAITA

### 2.1. DUOMENYS

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

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

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

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

## 2.2. BANDYMŲ ATASKAITA

Bandymų ataskaitoje turi būti tokia informacija:

### 2.2.1. Bandomoji medžiaga

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

### 2.2.2. Aparatūra

- tirpiklio rezervuaras, inertinės dujos, dujų pašalinimas iš eliuento, 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 (aparatas ir programinė įranga).

### 2.2.3. Sistemos kalibravimas

- kalibracinės kreivės gavimo metodo detalus aprašymas,
- informacija apie šio metodo kokybės kriterijus (pvz., koreliacijos koeficientą, paklaidų kvadratų sumą ir t. t.),

- informacija apie visas ekstrapoliacijas, prielaidas ir aproksimacijas, darytas bandymo eigoje ir vertinant bei apdorojant duomenis,
- visi matavimai, naudoti kalibracinei kreivei gauti, turi būti dokumentuoti lentelėje, kurioje kiekvienam kalibravimo taškui būtų pateikta tokia informacija:
  - bandinio pavadinimas,
  - bandinio gamintojas,
  - etalonų būdingosios vertės  $M_p$ ,  $M_n$ ,  $M_w$  ir  $M_w/M_n$ , kokias pateikė gamintojas, arba gautos vėlesniuose matavimuose, kartu nurodant nustatymo metodo detales,
  - injekcijos tūris ir injekcijos koncentracija,
  - kalibravimui naudota  $M_p$  vertė,
  - išmatuotas eliuavimo tūris arba pataisyta sulaikymo trukmė, atitinkantys smailės viršūnę,
  - smailės viršūnę atitinkanti apskaičiuota  $M_p$  vertė,
  - apskaičiuotos ir kalibravimui naudotos  $M_p$  vertės procentinė paklaida.

#### 2.2.4. Vertinimas:

- vertinimas atsižvelgiant į laiką: metodai taikyti reikiamam pakartojamumui užtikrinti (pataisų darymo metodas, vidinis standartas ir t. t.),
- informacija apie tai, ar vertinimas buvo atliekamas pagal eliuavimo tūrį ar pagal sulaikymo trukmę,
- informacija apie vertinimo ribas, jei smailė nėra iki galo analizuota,
- lyginimo metodų aprašymas, jei jie buvo taikyti,
- bandinio ruošimo ir išankstinio apdorojimo metodikos,
- duomenys apie neištirpusias daleles, jei yra,
- injekcijos tūris ( $\mu\text{l}$ ) ir injekcijos koncentracija ( $\text{mg/ml}$ )
- 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.

## Priedėlis

**Kitų polimerų skaitinės vidutinės molekulinės masės nustatymo metodų pavyzdžiai**

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

**1. Koligatyviųjų savybių naudojimas**

## 1.1. Ebulioskopija arba krioskopija:

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

Taikomumas:  $M_n < 20\ 000$ .

## 1.2. Garų slėgio mažėjimas:

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

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

## 1.3. Membraninė osmometrija:

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

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

## 1.4. Osmometrija garų fazėje:

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

Taikomumas:  $M_n < 20\ 000$ .

**2. Galinių grupių analizė**

Norint taikyti šį metodą, reikia žinoti bendrąją polimero sandarą ir jo galinių grupių (kurias nuo pagrindinės grandinės turi būti galima atskirti, pvz., taikant branduolių magnetinio rezonanso metodą arba titravimo (derivatizavimo) metodą) prigimtį. Pagal polimere esančių galinių grupių molekulinę koncentraciją gali būti nustatyta jo molekulinės masės vertė (7) (8) (9).

Taikomumas:  $M_n$  iki 50 000 (patikimumui mažėjant).

**3. Nuorodos**

1) Billmeyer, F.W. Jr., (1984). Textbook of Polymer Science, 3rd Edn., John Wiley, New York.



- 2) Glover, C.A., (1975). Absolute Colligative Property Methods. Chapter 4. In: Polymer Molecular Weights, Part I P.E Slade, Jr. ed., Marcel Dekker, New York.
- 3) ASTM D 3750–79, (1979). Standard Practice for Determination of Number-Average Molecular Weight of Polymers by Membrane Osmometry. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.
- 4) Coll, H. (1989). membrane Osmometry. In: Determination of Molecular Weight, A.R. Cooper ed., J. Wiley and Sons, p. 25–52.
- 5) ASTM 3592–77, (1977). Standard Recommended Practice for Determination of Molecular Weight by Vapour Pressure, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.
- 6) Morris, C.E.M., (1989). Vapour Pressure osmometry. In: 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.

## A.18. MAŽOS MOLEKULINĖS MASĖS MEDŽIAGŲ KIEKIS POLIMERUOSE

## 1. METODAS

Šis gelchromatografijos (Gel Permeation Chromatographic) metodas yra OECD TG 119 (1996) kopija. Pagrindiniai principai ir papildoma techninė informacija pateikta nuorodose.

## 1.1. ĮVADAS

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

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

## 1.2. APIBRĖŽTYS IR VIENETAI

Mažesnė nei 1 000 daltonų molekulinė masė sąlygiškai apibrėžiama kaip maža molekulinė masė.

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

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

kuriose:

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

$M_i$  = sulaikymo tūrį  $V_i$  atitinkančios polimero frakcijos molekulinė masė ir  $n$  yra duomenų taškų skaičius.

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

## 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 konkrečius bandymo specifinėmis sąlygomis. Svarbiausios sąlygos yra temperatūra, tirpiklis (arba tirpiklių mišinys), chromatografavimo sąlygos ir atskyrimo kolonėlė arba kolonelių 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 jų naudojimo prielaidos.

#### 1.4. BANDYMO METODO PRINCIPAS

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

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

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

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

Pagal šią kreivę nustatomas mažos molekulinės masės medžiagų kiekis. Apskaičiavimas gali būti tikslus tik tuo atveju, jei mažos molekulinės masės dalelių atsakas yra ekvivalentiškas jų masės daliai polimere.

#### 1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

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

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

( $M_p$  yra etalono molekulinė masė, atitinkanti smailės viršūnę).

#### 1.6. BANDYMO METODO APRAŠYMAS

##### 1.6.1. Etaloninių polistireno tirpalų ruošimas

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

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

##### 1.6.2. Bandinio tirpalo ruošimas

Iš esmės tie patys reikalavimai taikomi ruošiant bandinių tirpalus. Bandinys ištirpinamas tinkamame tirpiklyje, pvz., tetrahidrofurane, kruopščiai maišant. Jokiu būdu negalima tirpinti naudojant ultragarsinę vonią. Jei būtina, bandinio tirpalas gryninamas, filtruojant per membranių 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. Pataisos atsižvelgiant į priemaišų ir priedų kiekį

Paprastai būtina daryti medžiagų, kurių molekulinė masė  $M < 1\,000$ , kiekio pataisas atsižvelgiant į esančių nepolimerinių medžiagų (pvz., priemaišų ir (arba) priedų) indėlį, išskyrus kai nustatytas kiekis ir taip jau  $< 1\%$ . Tai daroma polimero tirpalo arba GPC eliuato tiesioginės analizės būdu.

Tais atvejais, kai išėjusio iš kolonėlės eliuato koncentracija tolesnei analizei per maža, jis turi būti koncentruojamas. Gali prireikti eliuatą išgarinti iki sauso likučio ir vėl jį ištirpinti. Eliuato koncentravimas turi būti atliktas tokiomis sąlygomis, kurios užtikrintų, kad eliuatas išliks nepakitęs. Eliuato apdorojimas po GPC pakopos priklauso nuo kiekybiniam nustatymui taikomo metodo.

#### 1.6.4. Aparatūra

GPC aparatą sudaro šios sudedamosios dalys:

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

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

#### 1.6.5. Išvirkštimas ir tirpiklio tiekimo sistema

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

1.6.7. **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 apskaičiuojamas 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:

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

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:

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

čia:

$V_{e1}, V_{e2}$	=	dvių 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).

1.6.9. **Tirpikliai**

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

1.6.10. **Temperatūros reguliavimas**

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

1.6.11. **Detektorius**

Detektoriaus paskirtis – kiekybiškai registruoti iš kolonėlės išplauto bandinio koncentraciją. Norint, kad smailės nebūtų labai plačios, detektoriaus kiuvetės tūris turi būti kuo mažesnis. Jis neturi būti didesnis kaip 10  $\mu$ l, išskyrus šviesos sklaidos ir klampumo detektorius. Aptikimui paprastai naudojama diferencinė refraktometrija.

Tačiau, jei to reikalauja bandinio specifinės savybės arba eliuavimo tirpiklis, gali būti naudojami kitų tipų detektoriai, pvz., UV/VIS, IR, klampumo detektoriai ir t. t.

## 2. DUOMENYS IR ATASKAITA

### 2.1. DUOMENYS

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

Kiekvienam bandiniui turi būti atlikti du nepriklausomi bandymai. Bandiniai turi būti analizuojami atskirai. Visais atvejais taip pat yra svarbu apskaičiuoti tuščių 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 pririekus pataisoma atsižvelgiant į priemaišas ir priedus. Eliuavimo kreivės paprastai vertinamos elektroninio duomenų apdorojimo būdu. Atliekant apskaičiavimus rankiniu būdu, galima pasižiūrėti į ASTM D 3536–91 (3).

Jei kolonėlėje sulaikomas koks nors netirpus polimeras, jo molekulinė masė greičiausiai yra didesnė nei tirpiosios dalies, ir jei į jo kiekį neatsižvelgti, gaunamas mažos molekulinės masės medžiagų kiekio pervertinimas. Papildy­me pateikiamos rekomendacijos, kaip daryti mažos molekulinės masės medžiagų kiekio pataisą atsižvelgiant į netirpų polimerą.

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

### 2.2. BANDYMO ATASKAITA

Bandymų ataskaitoje turi būti tokia informacija:

#### 2.2.1. Bandomoji medžiaga

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

#### 2.2.2. Aparatūra

- tirpiklio rezervuaras, inertinės dujos, dujų pašalinimas iš eliuento, eliuento sudėtis, priemaišos,
- siurblys, pulsacijų slopintuvas, injekcijos sistema,
- atskyrimo kolonėlės (gamintojas, visa informacija apie kolonėlių charakteristikas, pvz., porų dydis, atskyrimo medžiagos rūšis ir t. t., naudotų kolonėlių skaičius, ilgis ir jungimo tvarka),
- kolonėlės (arba jų rinkinio) teorinių lėkštelių skaičius, atskyrimo efektyvumas (sistemos atskyrimo galia),
- informacija apie smailių simetriją,

- kolonėlės temperatūra, temperatūros reguliavimo būdas,
- detektorius (matavimo principas, tipas, kiuvetės tūris),
- debitmatis, jei buvo naudotas (gamintojas, matavimo principas),
- duomenų registravimo ir apdorojimo sistema (aparatura 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,
  - kalibravimui naudota  $M_p$  vertė,
  - išmatuotas eliuavimo tūris arba pataisyta sulaikymo trukmė, atitinkantys smailės viršūnę,
  - smailės viršūnę atitinkanti apskaičiuota  $M_p$  vertė,
  - apskaičiuotos ir kalibravimui naudotos  $M_p$  vertės procentinė paklaida.

#### 2.2.4. **Informacija apie mažą molekulinę masę turinčio polimero kiekį**

- analizei taikytų metodų aprašymas ir bandymų atlikimo eiga,
- informacija apie mažos molekulinės masės medžiagų procentinę dalį (m/m), apskaičiuotą viso bandinio masei,
- informacija apie priemaišų, priedų ir kitų nepolimerinių medžiagų masės procentinę dalį, apskaičiuotą viso bandinio masei.

#### 2.2.5. **Vertinimas:**

- vertinimas atsižvelgiant į laiką: visi metodai taikyti reikiamam pakartojamumui užtikrinti (pataisų darymo metodas, vidinis standartas ir t. t.),
- informacija apie tai, ar vertinimas buvo atliekamas pagal eliuavimo tūrį ar pagal sulaikymo trukmę,
- informacija apie vertinimo ribas, jei smailė nėra iki galo analizuota,

- lyginimo metodų aprašymas, jei jie buvo taikyti,
- bandinio ruošimo ir išankstinio apdorojimo metodikos,
- duomenys apie neištirpusias daleles, jei yra,
- injekcijos tūris (µl) ir injekcijos koncentracija (mg/ml),
- stebėjimų duomenys, nurodantys veiksnius, kurie yra nukrypimų nuo teorinio GPC profilio priežastis,
- bandymo metodikose darytų visų pakeitimų detalus aprašymas,
- detalės apie paklaidų intervalus,
- bet kokia kita informacija ir stebėjimų duomenys, reikalingi duomenims interpretuoti.

### 3. NUORODOS

- 1) DIN 55672 (1995) Gelpermeationschromatographie (GPC) mit Tetrahydrofuran (THF) als Elutionsmittel, Teil 1.
- 2) Yau, W.W., Kirkland, J.J., and Bly, D.D. eds. (1979). Modern Size Exclusion Liquid Chromatography, J. Wiley and Sons.
- 3) ASTM D 3536–91, (1991). Standard Test method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution by Liquid Exclusion Chromatography (Gel Permeation Chromatography-GPC). American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.
- 4) ASTM D 5296–92, (1992). Standard Test method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution of Polystyrene by High Performance Size-Exclusion Chromatography. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.



*Priedėlis***Nurodymai, kaip daryti mažos molekulinės masės medžiagos kiekio pataisas dėl netirpus polimero buvimo**

Kai bandinyje yra netirpus polimero, GPC analizės metu prarandama masė. Netirpus polimeras negrįžtamai su-laikomas 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 pa-taisa daroma naudojant išorinį kalibravimą žinomos koncentracijos etaloninėmis medžiagomis bei dn/dc refrak-tometro atsakui kalibruoti. Čia pateiktame pavyzdyje naudojamas polimetilmetakrilato (pMMA) etalonas.

Norint akrilo polimerų analizėje atlikti išorinį kalibravimą, GPC metodu analizuojamas žinomos koncentracijos pMMA tirpalas tetrahidrofurane ir gauti duomenys naudojami refraktometro konstantai nustatyti pagal lygtį:

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

čia:

- K = refraktometro konstanta (mikrovoltas iš sekundės mililitrui),
- R = pMMA etalono atsakas (mikrovoltas iš sekundės),
- C = pMMA etalono koncentracija (mg/ml),
- V = injekcijos tūris (ml), ir
- dn/dc = tetrahidrofurane ištirpinto pMMA lūžio rodiklio pokytis (ml/mg).

Tipiniai pMMA etalono duomenys:

- R = 2937 891,
- C = 1,07 mg/ml,
- V = 0,1 ml,
- dn/dc =  $9 \times 10^{-5}$  ml/mg.

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

A.19. **POLIMERŲ TIRPUMAS VANDENYJE/EKSTRAHAVIMASIS IŠ VANDENS**1. **METODAS**

Aprašytas metodas yra OECD TG 120 (1997) pataisytos versijos kopija. Kita techninė informacija pateikta (1) nuorodoje.

1.1. **ĮVADAS**

Prieš taikant toliau išdėstytą metodą, kai kuriems polimerams, pvz., emulsiniams polimerams, gali būti reikalingi paruošiamieji darbai. Metodas netaikomas skystiesiems polimerams ir polimerams, kurie bandymo sąlygomis reaguoja su vandeniu.

Kai metodą taikyti netikslinga arba neįmanoma, polimerų tirpumas (ekstrahavimas) gali būti tiriamas kitų metodų pagalba. Tokiais atvejais turi būti pateiktos visos metodo detalės ir pagrindimas.

1.2. **ETALONINĖS MEDŽIAGOS**

Nėra.

1.3. **BANDYMO METODO PRINCIPAS**

Polimerų tirpumas (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. **BANDYMO METODO APRAŠYMAS**1.5.1. **Įranga**

Bandant šiuo metodu reikalinga tokia įranga:

- trupintuvas, pvz., malūnas žinomo dydžio dalelėms gauti,
- purtyklė, kurioje būtų galima reguliuoti temperatūrą,
- membraninių filtrų sistema,
- atitinkama analizinė įranga,
- standartizuoti sietai.

1.5.2. **Bandinio ruošimas**

Reprezentatyvus bandinys iš pradžių turi būti susmulkintas iki 0,125–0,25 mm dydžio dalelių, naudojant atitinkamus sietus. Bandinio patvarumui užtikrinti arba malimo procese gali būti reikalingas aušinimas. Medžiagos gumos pagrindu gali būti trupinamos skystojo azoto temperatūroje (1).

Jei reikiamo dydžio dalelių frakcijos gauti negalima, turi būti imtasi veiksmų dalelių dydžiui kiek įmanoma sumažinti, o rezultatas turi būti pateiktas ataskaitoje. Ataskaitoje būtina nurodyti būdą, kaip sutrupintas bandinys buvo laikomas prieš bandymą.

### 1.5.3. Bandymo eiga

Į tris indus su stikliniais kamščiais atskirai pasveriami trys bandomosios medžiagos 10 g masės bandiniai ir į kiekvieną indą įpilama 1 000 ml vandens. Jei pasirodo, kad 10 g polimero apdoroti nėra galimybės, turi būti naudojamas kitas gretimas didžiausias kiekis, kurį galima apdoroti, o vandens tūris atitinkamai keičiamas.

Indai gerai užkemšami ir purtomi 20 °C temperatūroje. Turi būti naudojamas purtymo arba maišymo įtaisas, galintis veikti pastovioje temperatūroje. Po 24 valandų kiekvieno indo turinys centrifuguojamas arba filtruojamas ir atitinkamu analizės metodu skaidrioje vandeninėje fazėje nustatoma polimero koncentracija. Jei tinkamų metodų analizuoti vandeninėje terpėje nėra, bendrasis tirpumas (ekstrahavimasis) gali būti nustatytas pagal sauso likučio ant filtro arba sausių centrifugavimo nuosėdų masę.

Paprastai būtina kiekybiškai atskirti priemaišas ir priedus nuo mažos molekulinės masės medžiagų. Gravimetrinio nustatymo atveju, norint atsižvelgti į likučius, atsirandančius dėl bandymo metodikos taikymo, svarbu atlikti tuščiąjį bandymą be bandomosios medžiagos.

Polimerų tirpumas (ekstrahavimasis) vandenyje 37 °C temperatūroje ir esant pH 2 bei pH 9 gali būti nustatytas tokiu pat būdu, kuris aprašytas atliekant bandymą 20 °C temperatūroje. pH vertė gali būti reguliuojama pridedant tinkamo buferinio tirpalo arba tinkamų rūgščių ar šarmų, pvz., druskos rūgšties, acto rūgšties, analiziškai gryno natrio ar kalio hidroksido, arba NH<sub>3</sub>.

Atsižvelgiant į taikomą analizės metodą turi būti atliekami vienas arba du bandymai. Kai yra specifiniai tiesioginės polimerų komponentų analizės vandeninėje terpėje metodai, turėtų pakakti vieno anksčiau aprašyto bandymo. Tačiau kai tokių metodų nėra, o polimero tirpumo (ekstrahavimosi) nustatymas apribotas tik netiesiogine analize, vandeniniame ekstrakte nustatant tik bendrosios organinės anglies kiekį (BOA), turi būti atliktas papildomas bandymas. Be to, šis papildomas bandymas turi būti atliekamas tris kartus, naudojant 10 kartų mažesnius polimero bandinius ir tuos pačius vandens kiekius, kurie buvo naudojami pirmajame bandyme.

### 1.5.4. Analizė

#### 1.5.4.1. Vieno dydžio bandinio analizė

Gali būti naudojami tiesioginės polimero komponentų analizės vandeninėje terpėje metodai. Kaip alternatyvą galima būtų svarstyti galimybę netiesiogiai analizuoti ištirpintų/ekstrahuotų polimerų komponentus, nustatant bendrąjį tirpiųjų dalių kiekį ir darant pataisas dėl polimerams nebūdingų komponentų buvimo.

Analizė vandeninėje fazėje visų polimerinių medžiagų bendrajam kiekiui nustatyti galima:

jei taikomas pakankamai jautrus metodas, pvz.:

- BOA nustatymas, taikant šlapią suardymą persulfatu arba dichromatu CO<sub>2</sub> gauti, kurio kiekis įvertinamas IR arba cheminės analizės metodu,
- atominė absorbcinė analizė (AAS) arba jos induktyviai sužadintos plazmos (ICP) emisijos atitikmuo silicio arba metalų turintiems polimerams nustatyti,
- UV absorbcija arba spektrofluorimetrija polimerams su vienvalente aromatine grupe,
- LC-MS (skysčių chromatografija – masių spektroskopija) mažos molekulinės masės bandiniams,

arba atliekamas vandeninio ekstrakto garinimas vakuume iki sauso likučio ir jo spektrinė analizė (IR, UV ir t. t.) arba likučio AAS (ICP) analizė.

Jei pačios vandeninės fazės analizė neįmanoma, vandeninis ekstraktas turi būti ekstrahuojamas organiniu tirpikliu, kuris nesimaišo su vandeniu, pvz., chlorintuoju angliavandeniliu. Tirpiklis vėliau išgarinamas, o likutis analizuojamas, kaip anksčiau nurodyta, polimero kiekiui nustatyti. Visų šio likučio komponentų, kurie identifikuojami kaip priemaišos arba priedai, kiekis turi būti atimtas, kad būtų galima nustatyti paties polimero tirpumo (ekstrahavimosi) laipsnį.

Kai tokių medžiagų kiekis yra gana didelis, likutį gali tekti analizuoti, pvz., HPLC (didelio efektyvumo skysčių chromatografijos) arba GPC (gelchromatografijos) metodais, kurių pagalba priemonės būtų atskirtos nuo monomero ir jo darinų, kad būtų galima nustatyti tikrąjį pastarųjų medžiagų kiekį.

Kai kuriais atvejais gal būt pakaktų tiesiog išgarinti organinį tirpiklį iki sauso likučio ir jį pasverti.

#### 1.5.4.2. *Bandymas su dviem skirtingo dydžio bandiniais*

Visuose vandeniniuose ekstraktuose atliekama BOA analizė.

Neištirpusi bandinio dalis (likutis po ekstrahavimo) analizuojama gravimetriškai. Jei po kiekvieno indo turinio centrifugavimo arba filtravimo, polimero likučiai lieka ant indo sienelių, indas turi būti skalaujamas filtratu tol, kol inde nelieka jokių matomų likučių. Toliau filtratas vėl centrifuguojamas arba filtruojamas. Ant filtro arba centrifugavimo mėgintuvėlyje esantis likutis džiovinamas vakuume 40 °C temperatūroje ir sveriamas. Džiovinama tol, kol gaunama pastovi masė.

## 2. **DUOMENYS**

### 2.1. **BANDYMAS, ATLIKTAS NAUDOJANT VIENO DYDŽIO BANDINĮ**

Turi būti pateikti kiekvienai iš trijų kolbų gauti atskiri rezultatai ir jų vidutinės vertės, išreiškiant masės vienetais tirpalo tūriui (paprastai mg/l) arba masės vienetais polimero masei (paprastai mg/g). Taip pat papildomai turi būti pateiktas bandinio masės nuostolis (apskaičiuotas tirpinio masę dalinant iš pradinio bandinio masės). Turi būti apskaičiuoti variacijos koeficientai. Atskiri skaičiai turi būti pateikti visai medžiagai (polimeras + pagrindiniai priedai ir t. t.) ir tik polimerui (t. y. atimant tokių priedų indėlių).

### 2.2. **BANDYMAS, ATLIKTAS NAUDOJANT DU SKIRTINGO DYDŽIO BANDINIUS**

Turi būti pateiktos atskiros BOA kiekio vandeniniuose ekstraktuose vertės, gautos dviejuose trigubuose bandymuose, ir kiekvieno bandymo vidutinė vertė, išreiškiant masės vienetais tirpalo tūriui (paprasta mgC/l), taip pat masės vienetais pradinio bandinio masei (paprastai mgC/g).

Jei tarp rezultatų, gautų 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 paprastai nebūtina.

Turi būti pateiktos likučių atskiros masės ir išreikštos pradinės bandinio masės procentais. Turi būti apskaičiuojamos gautos vidutinės vertės. Skirtumas tarp 100 ir nustatyto procentinio kiekio rodo tirpios ir ekstrahuojamos medžiagos procentinį kiekį pradiniam bandinyje.

## 3. **ATASKAITA**

### 3.1. **BANDYMO ATASKAITA**

Bandymo ataskaitoje turi būti tokia informacija:

#### 3.1.1. **Bandomoji medžiaga**

— turima informacija apie bandomąją medžiagą (tapatumas, priedai, priemonės, 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.

## A.20. OKSIDACINĖS SAVYBĖS (SKYSČIAI)

## 1. METODAS

## 1.1. ĮVADAS

Šis bandymų metodas skirtas matuoti skystosios medžiagos gebą padidinti degiosios medžiagos degimo greitį arba degimo intensyvumą arba sudaryti mišinį su degiąja medžiaga, kuris užsidega savaime, kai dvi medžiagos sumaišomos kartu. Jis yra pagrįstas JT bandymu, taikomu oksiduojamiesiems skysčiams (1), ir jį atitinka. Tačiau, kadangi šis A.21 metodas visų pirma rengiamas siekiant atitikti Direktyvos 67/548 reikalavimus, reikia lyginti tik su viena etalonine medžiaga. Bandymas ir lyginimas su papildomomis etaloninėmis medžiagomis gali būti reikalingas, kai bandymų rezultatus numatoma naudoti kitais tikslais (1).

Šio bandymo daryti nereikia, kai tiriant struktūrinę formulę neabejotinai nustatoma, kad medžiaga negali egzotermiškai reaguoti su degiąja medžiaga.

Prieš darant šį bandymą naudinga turėti išankstinės informacijos apie visas galimas medžiagos sprogiasias 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).

Be to, jei bandytojas numato, kad šio bandymo rezultatai gali būti naudojami kitais tikslais (1), pasirinktinai gali būti tikslinga naudoti papildomas etalonines medžiagas (3).

## 1.4. BANDYMO METODO PRINCIPAS

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, atliekamas visas bandymas. Mišinys kaitinamas slėgio inde ir nustatomas vidutinis laikas, per kurį slėgis, palyginti su atmosferos slėgiu, padidėja nuo 690 kPa iki 2 070 kPa. Šis padidėjęs slėgis lyginamas su vidutine etaloninės (-ių) medžiagos (-ių) 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) Pvz., JT transporto reglamentų kontekste.

(2) Prieš bandymus rūgštis turėtų būti titruojama jos koncentracijai patvirtinti.

(3) Pvz.: 1 nuorodoje naudojama 50 % (m/m) perchlorato rūgštis ir 40 % (m/m) natrio chloratas.

## 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  $\mu\text{m}$ , o vidutinis skersmuo – 25  $\mu\text{m}$  <sup>(1)</sup>. Ne didesnio kaip 25 mm storio celiuliozės sluoksniu 4 h džiovinamas iki pastoviosios masės esant 105 °C ir aušinamas bei prieš bandymą laikomas desikatoriuje su džiovikliu. Vandens kiekis išdžiovintoje celiuliozėje turi būti mažesnis kaip 0,5 % sausos medžiagos masės <sup>(2)</sup>. Prireikus džiovinimo trukmė turi būti padidinta tokiam drėgmės kiekiui pasiekti <sup>(3)</sup>. Viso bandymo metu turi būti naudojama ta pati celiuliozės siunta.

## 1.6.1.2. Aparatūra

## 1.6.1.2.1. Slėginis indas

Būtina turėti slėginį indą. Slėginį indą sudaro 89 mm ilgio ir 60 mm išorinio skersmens plieninis cilindras (žr. 1 paveikslą). Staklėmis gaminamos dvi plokštelės priešingiems cilindro galams (sumažinančios skerspjuvį iki 50 mm), kurios padėtų įtvirtinti cilindą, įstatant uždegimo žvakę ir ventiliavimo angos akli dangtį. 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 atvamzdžis įsriegiamas į kreivą slėginio indo paviršių 35 mm nuo vieno galo ir 90° kampu ištekintoms plokštelėms. Gręžiama 12 mm gylio anga, kurioje daromas sriegis įsukti atvamzdžiui, turinčiam 1/2“ Britų standarto vamzdinį (arba jo metrinio atitikmens) sriegį. Prireikus įstatomas inertinės medžiagos sandariklis hermetiškumui užtikrinti. Atvamzdžio ilgis, matuojant nuo slėginio indo korpuso, lygus 55 mm, jame išgręžiama 6 mm skersmens anga. Atvamzdžio galas platinamas ir įsriegiamas diafragminio tipo slėgio keitliui įsukti. Galima naudoti bet kurį slėgio matavimo įtaisą, kurio neveiktų karštos dujos arba skilimo produktai ir kuris galėtų matuoti slėgio didėjimo greitį nuo 690 iki 2 070 kPa ne ilgiau kaip per 5 ms.

Į tolesnį nuo atvamzdžio slėginio indo galą įsukama uždegimo žvakė, turinti du elektrodus, vieną izoliuotą nuo korpuso, o kitą įžemintą žvakės korpusė. Į kitą slėginio indo galą įstatoma trūkioji membrana (trūkimo slėgis maždaug 2 200 kPa), kurią laiko kamštis su 20 mm anga. Prireikus uždegimo žvakė sandarinama inertinės medžiagos sandarikliu hermetiškumui užtikrinti. Visą sąranka tvirtinama laikinajame stovė naudojimui tinkamame aukštyje (2 paveikslas). Stovą paprastai sudaro mažaanglio plieno pagrindo plokštė, kurios matmenys yra 235 mm × 184 mm × 6 mm, ir 185 mm ilgio kvadratinė tuščiaavidurė sekcija, kurios matmenys – 70 mm × 70 mm × 4 mm.

Vienas kvadratinės tuščiaavidurės sekcijos galas nupjaunamas iš abiejų priešingų šonų dviem plokščiabriaunėms 86 mm ilgio kojoms gauti. Šių plokščiųjų šonų galai nupjaunami 60° kampu ir privirinami prie pagrindo plokštės. Viename viršutinio galo šone išpjaunama 22 mm pločio ir 46 mm gylio anga, į kurią įsistato slėginio indo atvamzdžis, kai visa slėginio indo sąranka uždegimo žvake žemyn nuleidžiama į laikantįjį stovą. Prie žemesnės tuščiaavidurės sekcijos sienos iš vidaus privirinamas 30 mm pločio ir 6 mm storio plieninis fiksatorius. Priešingoje sienoje įsriegiamos angos dviem 7 mm ilgio sparnuotosioms veržlėms, kurios neleistų slėginiam indui judėti. Slėginiam indui laikyti iš apačios prie šoninių sienų privirinamos dvi 12 mm pločio ir 6 mm storio plieninės juostos, įremtos į tuščiaavidurės sekcijos pagrindą.

## 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  $\Omega/\text{m}$ . 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 <sup>(4)</sup>

Aparatas su slėgio keitliu ir kaitinimo sistema, bet be trūkiosios membranos, tvirtinamas stovė uždegimo žvake žemyn. Cheminėje stiklinėje stikline lazdele <sup>(5)</sup> 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 tapšnojančiomis ir užtikrinti, kad jis būtų dedamas apie uždegimo apviją ir gerai su ja liestųsi. Svarbu kad dedant mišinį apvijai

<sup>(1)</sup> P vz., Whatman Column Chromatographic Cellulose Powder CF 11, katalogo Nr. 4021 050.

<sup>(2)</sup> Patvirtinama, pvz., titruojant Karlo Fišerio metodu.

<sup>(3)</sup> Be to, tokį drėgmės kiekį galima pasiekti kitu metodu, pvz., 24 h kaitinant vakuume esant 105 °C.

<sup>(4)</sup> Oksidatoriaus ir celiuliozės mišiniai turi būti laikomi potencialiai sprogiais mišiniais, todėl su jais reikia elgtis atsargiai.

<sup>(5)</sup> Praktiškai tai galima padaryti ruošiant didesnę nei bandymui reikiamą bandomojo skysčio ir celiuliozės 1:1 mišinio kiekį ir supilant 5 ± 0,1 g į slėginį indą. Kiekvienam bandymui ruošiamas naujas mišinys.

nebūtų deformuota, kadangi dėl to gali būti gauti klaidingi rezultatai <sup>(1)</sup>. Trūkioji membrana dedama į vietą ir gerai užsukamas tvirtinimo kamštis. Indas su įkrova trūkiąja membrana į viršų įstatomas į laikantįjį stovą, kuris turi būti statomas tinkamoje šarvuotoje traukos spintoje arba deginimo kameroje. Prie uždegimo žvakės kontaktų jungiamas maitinimo šaltinis ir įjungiama 10 A srovė. Laikas nuo maišymo pradžios iki maitinimo įjungimo turi būti ne didesnis kaip 10 min.

Slėgio keitliu gautas signalas užrašomas tinkama sistema, kuri leistų gauti nepertraukiamą slėgio kitimo laike kreivę ir kartu ją analizuoti (pvz., pereinamųjų vyksmų sąvirašis, sujungtas su diagramų sąvirašiu). Mišinys kaitinamas tol, kol plyšta trūkiąja membrana, arba bent 60 s. Jei trūkiąja membrana neplyšta, mišinys paliekamas aušti prieš tai jį atsargiai atidarant, imantis atsargumo priemonių, jei slėginiame inde dar būtų per didelis slėgis. Medžiaga ir kiekviena etaloninė medžiaga bandoma penkis kartus. Užrašomas laikas, per kurį slėgis padidėja nuo 690 kPa iki 2 070 kPa virš atmosferos slėgio. Apskaičiuojama vidutinė slėgio didėjimo trukmė.

Kartais medžiagos gali sukelti slėgio didėjimą (per didelį arba per mažą), kurio priežastis cheminės reakcijos, neapibūdinančios medžiagos oksiduojamųjų savybių. Tokiais atvejais norint nustatyti reakcijos tipą, bandymą gali tekti kartoti, vietoj celiuliozės naudojant inertinę medžiagą, pvz., diatomitą.

## 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 <sup>(a)</sup>

Medžiaga <sup>(b)</sup>	1:1 mišinio su celiulioze vidutinė slėgio didėjimo trukmė (ms)
Amonio dichromatas, sotusis vandeninis tirpalas	20 800
Kalcio nitratas, sotusis vandeninis tirpalas	6 700
Geležies (III) nitratas, sotusis vandeninis tirpalas	4 133
Ličio perchloratas, sotusis vandeninis tirpalas	1 686
Magnio perchloratas, sotusis vandeninis tirpalas	777
Nikelio nitratas, sotusis vandeninis tirpalas	6 250
Azoto rūgštis, 65 %	4 767 <sup>(c)</sup>
Perchlorato rūgštis, 50 %	121 <sup>(c)</sup>
Perchlorato rūgštis, 55 %	59
Kalio nitratas, 30 % vandeninis tirpalas	26 690
Sidabro nitratas, sotusis vandeninis tirpalas	<sup>(d)</sup>
Natrio chloratas, 40 % vandeninis tirpalas	2 555 <sup>(e)</sup>

<sup>(1)</sup> Visų pirma turi būti išvengta gretimų apvijų vijų sąlyčio.



Medžiaga <sup>(b)</sup>	1:1 mišinio su celiulioze vidutinė slėgio didėjimo trukmė (ms)
Natrio nitratas, 45 % vandeninis tirpalas	4 133
<i>Inertinė medžiaga</i>	
Vanduo: celiuliozė	<sup>(d)</sup>

<sup>(a)</sup> Žr. 1 nuorodą dėl klasifikavimo pagal JT transportavimo schemą.  
<sup>(b)</sup> Sotieji tirpalai turi būti ruošiami esant 20 °C.  
<sup>(c)</sup> Vidutinė vertė, gauta darant tarplaboratorinius lyginamuosius tyrimus.  
<sup>(d)</sup> Didžiausias 2 070 kPa slėgis nebuvo pasiektas.

### 3. ATASKAITA

#### 3.1. BANDYMO ATASKAITA

Bandymų ataskaitoje pateikiama ši informacija:

- bandomosios medžiagos tapatumas, sudėtis, grynumas ir kitos savybės,
- bandomosios medžiagos koncentracija,
- naudojamos celiuliozės džiovinimo metodika,
- drėgmės kiekis naudojamoje celiuliozėje,
- matavimų rezultatai,
- inertinės medžiagos bandymų rezultatai, jei yra,
- apskaičiuotosios vidutinės slėgio didėjimo trukmės vertės,
- visi nukrypimai nuo šio metodo ir jų pagrįstumas,
- visa papildoma informacija arba pastabos rezultatams interpretuoti.

#### 3.2. REZULTATŲ AIŠKINIMAS <sup>(1)</sup>

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

<sup>(1)</sup> Žr. 1 nuorodą dėl rezultatų pagal JT transportavimo reglamentus interpretavimo, kai naudojamos kelios etaloninės medžiagos.

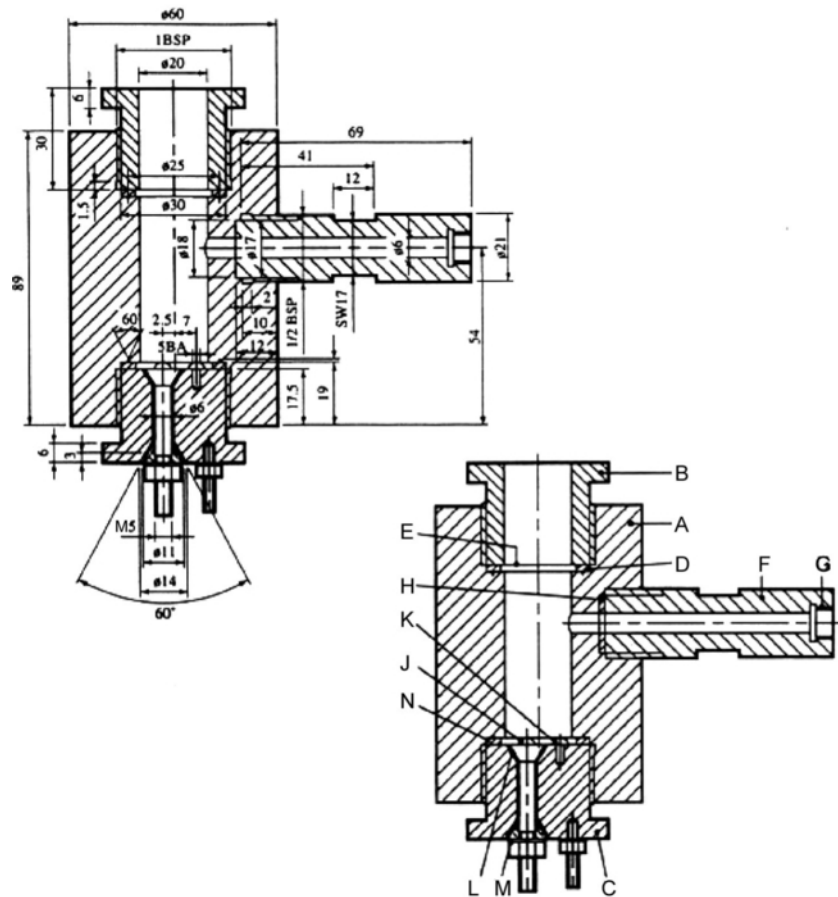
- b) medžiagos ir celiuliozės santykio 1:1 mišinio, masės dalimis, vidutinė slėgio didėjimo trukmė yra mažesnė arba lygi 65 % (m/m) vandeninio azoto rūgšties tirpalo ir celiuliozės santykio 1:1 mišinio, masės dalimis, vidutinei slėgio didėjimo trukmei.

Siekiant išvengti klaidingų teigiamų rezultatų, interpretuojant juos reikėtų atsižvelgti į rezultatus, gautus bandant medžiagą su inertine medžiaga.

#### 4. NUORODOS

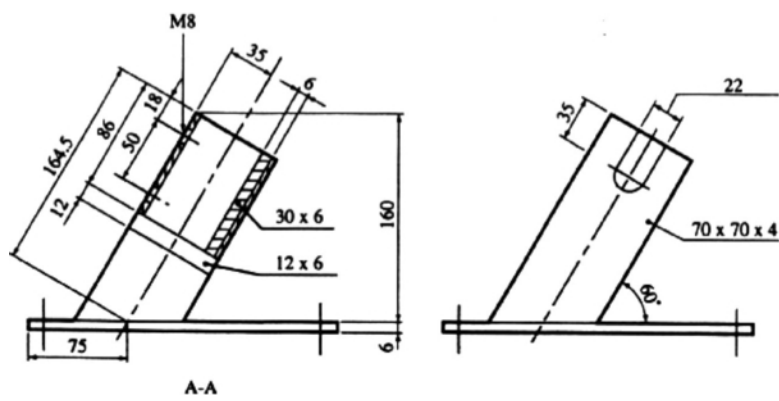
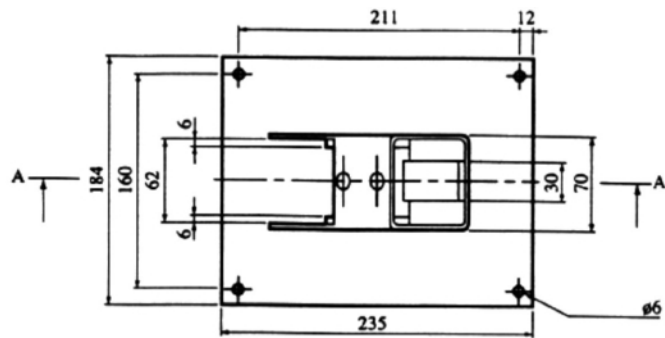
Recommendations on the Transport of Dangerous Goods, Manual of Tests and Criteria. 3rd revised edition. UN Publication No: ST/SG/AC.10/11/Rev. 3, 1999, page 342. Test O.2: Test for oxidizing liquids.

1 paveikslas  
Slėginis indas

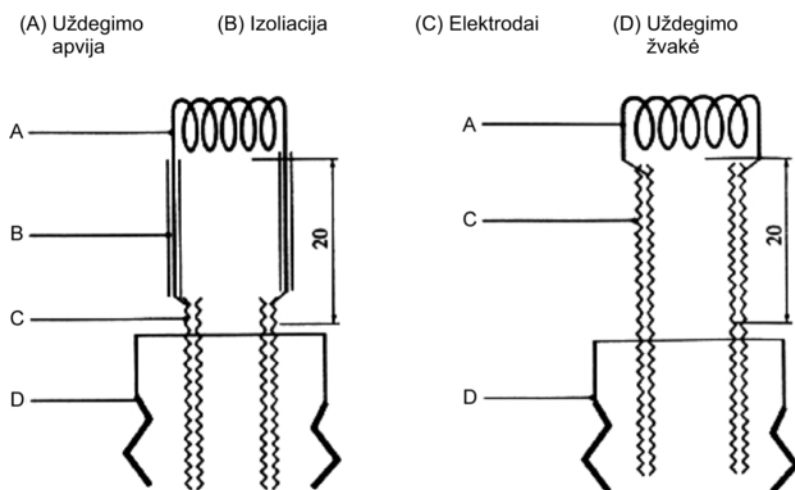


- |                                     |   |                           |
|-------------------------------------|---|---------------------------|
| (A) Slėginio indo korpusas          | (B) Trūkiosios membranos tvirtinimo kamštis | (C) Uždegimo žvakė        |
| (D) Minkštas švininis tarpiklis     | (E) 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 |   |                           |

2 paveikslas  
Laikantysis stovas



3 paveikslas  
Uždegimo sistema



Pastaba: galima naudoti bet kurią iš šių schemų.

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

TURINYS

	BENDRASIS ĮVADAS .....	144
B.1 bis.	ŪMUS TOKSIŠKUMAS PER VIRŠKINAMĄJĮ TRAKTĄ. FIKSUOTŪJŲ DOZIŲ MET ODA	146
B.1 tris.	ŪMUS TOKSIŠKUMAS PER VIRŠKINAMĄJĮ TRAKTĄ. ŪMAUS TOKSIŠKUMO KLASĖS METODAS .....	159
B.2.	ŪMUS TOKSIŠKUMAS (PER KVĖPAVIMO TAKUS) .....	175
B.3.	ŪMUS TOKSIŠKUMAS (PER ODA) .....	179
B.4.	ŪMUS TOKSIŠKUMAS. ODOS DIRGINIMAS AR ĖSDINIMAS .....	183
B.5.	ŪMUS TOKSIŠKUMAS. AKIŲ DIRGINIMAS AR ĖSDINIMAS .....	192
B.6.	ODOS JAUTRINIMAS .....	203
B.7.	KARTOTINIŲ DOZIŲ (28 DIENŲ) TOKSIŠKUMAS (PER VIRŠKINAMĄJĮ TRAKTĄ) .....	211
B.8.	KARTOTINIŲ DOZIŲ (28 DIENŲ) TOKSIŠKUMAS (PER KVĖPAVIMO TAKUS) .....	217
B.9.	KARTOTINIŲ DOZIŲ (28 DIENŲ) TOKSIŠKUMAS (PER ODA) .....	222
B.10.	MUTAGENIŠKUMAS – ŽINDUOLIŲ CHROMOSOMŲ ABERACIJŲ BANDYMAS <i>IN VITRO</i> .....	226
B.11.	MUTAGENIŠKUMAS – ŽINDUOLIŲ KAULŲ ČIULPŲ CHROMOSOMŲ ABERACIJOS BANDYMAS <i>IN VIVO</i> .....	234
B.12.	MUTAGENIŠKUMAS – ŽINDUOLIŲ ERITROCITŲ MAŽŪJŲ BRANDUOLIŲ BANDYMAS <i>IN VIVO</i> .....	241
B.13/14.	MUTAGENIŠKUMAS – BAKTERIJŲ GRĮŽTAMŪJŲ MUTACIJŲ BANDYMAS .....	249
B.15.	MUTAGENIŠKUMO BANDYMAS IR ATRANKA PAGAL KANCEROGENIŠKUMĄ, <i>SACCAROMYCES CEREVISIAE</i> GENŲ MUTACIJOS .....	257
B.16.	MITOZINĖ REKOMBINACIJA – <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> .....	260
B.17.	MUTAGENIŠKUMAS – ŽINDUOLIŲ LAŠTELIŲ GENŲ MUTACIJŲ BANDYMAS <i>IN VITRO</i> .....	263
B.18.	DNR PAŽAIDOS IR JŲ REPARACIJA – NETAISYKLINGA DNR SINTEZĖ – ŽINDUOLIŲ LAŠTELĖSE <i>IN VITRO</i> .....	272
B.19.	APSIKEITIMO SESERINĖMIS CHROMATIDĖMIS BANDYMAS <i>IN VITRO</i> .....	276
B.20.	<i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i> NUO LYTIES PRIKLAUSOMO RECESYVINIO LETALIŠKUMO BANDYMAS .....	280
B.21.	ŽINDUOLIŲ LAŠTELIŲ TRANSFORMACIJOS BANDYMAI <i>IN VITRO</i> .....	283
B.22.	GRAUŽIKŲ DOMINANTINIS LETALIŠKUMO BANDYMAS .....	286
B.23.	ŽINDUOLIŲ SPERMATOGONIJŲ CHROMOSOMŲ ABERACIJOS BANDYMAS .....	289
B.24.	PELIŲ TAŠKINIS BANDYMAS .....	296

B.25.	PELIŲ PAVELDĖTA TRANSLOKACIJA .....	299
B.26.	POŪMIS TOKSIŠKUMAS PER VIRŠKINAMĄJĮ TRAKTĄ. 90 DIENŲ KARTOTINIŲ DOZIŲ TOKSIŠKUMO GRAUŽIKAMS BANDYMAS .....	303
B.27.	POŪMIS TOKSIŠKUMAS PER VIRŠKINAMĄJĮ TRAKTĄ. 90 DIENŲ KARTOTINIŲ DOZIŲ TOKSIŠKUMO NE GRAUŽIKAMS BANDYMAS .....	309
B.28.	POŪMIS TOKSIŠKUMAS PER ODA. 90 DIENŲ KARTOTINIŲ DOZIŲ TOKSIŠKUMO GRAUŽIKAMS BANDYMAS .....	315
B.29.	POŪMIS TOKSIŠKUMAS PER KVĖPAVIMO TAKUS. 90 DIENŲ KARTOTINIŲ DOZIŲ TOKSIŠKUMO GRAUŽIKAMS BANDYMAS .....	319
B.30.	LĒTINIO TOKSIŠKUMO BANDYMAS .....	324
B.31.	TOKSIŠKUMO PRENATALINIAM VYSTYMUISI BANDYMAS .....	330
B.32.	KANCEROGENIŠKUMO BANDYMAS .....	339
B.33.	KOMBINUOTAS LĒTINIO TOKSIŠKUMO IR KANCEROGENIŠKUMO BANDYMAS .....	345
B.34.	TOKSIŠKUMO VIENOS KARTOS DAUGINIMUISI BANDYMAS .....	352
B.35.	TOKSIŠKUMO DVIEJŲ KARTŲ DAUGINIMUISI BANDYMAS .....	356
B.36.	TOKSIKOKINETIKA .....	366
B.37.	ORGANINIŲ FOSFORO JUNGINIŲ SUKELTO UŖDELSTO NEUROTOKSIŠKUMO PO ŪMAUS VEIKIMO MEDŢIAGA BANDYMAS .....	370
B.38.	ORGANINIŲ FOSFORO JUNGINIŲ SUKELTO UŖDELSTO NEUROTOKSIŠKUMO 28 DIENŲ BANDYMAS .....	375
B.39.	NENUMATYTOS DNR SINTEZĒS (NDS) ŢINDUOLIŲ KEPENŲ LAŖTELĒSE BANDYMAS <i>IN VIVO</i> .....	379
B.40.	ODOS SUARDYMAS <i>IN VITRO</i> . ODOS SLUOKSNIO ELEKTRINĒS VARŢOS (OSEV) BANDYMAS .....	385
B.40 bis.	ODOS SUARDYMAS <i>IN VITRO</i> . ŢMOGAUS ODOS MODELIO BANDYMAS .....	395
B.41.	3T3 NRU FOTOTOKSIŠKUMO <i>IN VITRO</i> BANDYMAS .....	401
B.42.	ODOS JAUTRINIMAS. VIETINIO LIMFMAZGIO BANDYMAS .....	415
B.43.	NEUROTOKSIŠKUMO GRAUŽIKAMS BANDYMAS .....	421
B.44.	SUGERTIS PER ODA. <i>IN VIVO</i> METODAS .....	433
B.45.	SUGERTIS PER ODA. <i>IN VITRO</i> METODAS .....	439

**BENDRASIS ĮVADAS****A. BANDOMOSIOS MEDŽIAGOS APIBŪDINIMAS**

Bandomosios medžiagos sudėtį, taip pat ir pagrindines priemaišas, bei jos svarbiausias fizikines ir chemines savybes, tarp jų stabilumą, reikėtų žinoti dar prieš bet kokio toksikologinio bandymo planavimą.

Bandomosios medžiagos fizikinės ir cheminės savybės yra svarbi informacija renkantis veikimo medžiaga būdą, planuojant kiekvieną konkretų bandymą ir elgimąsi su medžiaga bei jos laikymą.

Bandomosios medžiagos (jeigu įmanoma ir pagrindinių priemaišų) dozuojuamoje terpėje ar biologinėje medžiagoje nustatymo kokybinius ir kiekybinius analitinius metodus reikėtų parengti dar prieš bandymą.

Visą informaciją, susijusią su medžiagos nustatymu, fizikinėmis ir cheminėmis jos savybėmis, grynumu, bandomosios medžiagos elgsena, reikėtų įtraukti į bandymo ataskaitą.

**B. GYVŪNŲ PRIEŽIŪRA**

Atliekant toksikologinį bandymą, būtina griežta aplinkos sąlygų kontrolė ir tinkama gyvūnų priežiūra.

*i) Laikymo sąlygos*

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

Tam tikrų eksperimentinių metodų atveju labai svarbi temperatūra, todėl tokiais atvejais bandymo metodo aprašyme nurodomos tinkamos sąlygos. Visuose toksiškumo bandymuose temperatūra ir drėgnis turėtų būti stebimi, registruojami ir įtraukiami į baigiamąją bandymo ataskaitą.

Apšvietimas turi būti dirbtinis, šviesos režimas – 12 valandų šviesos ir 12 valandų tamsos. Apšvietimo duomenys turėtų būti registruojami ir įtraukiami į baigiamąją bandymo ataskaitą.

Jei metode kitaip nenurodoma, gyvūnai gali būti laikomi po vieną arba tos pačios lyties individų grupėmis, tačiau viename narve neturėtų būti daugiau negu penki gyvūnai.

Eksperimentų su gyvūnais ataskaitose svarbu nurodyti gyvūnų laikymo būdą bei jų skaičių viename narve medžiagos eksperimento bei vėlesniu stebėjimo periodu.

*ii) Šėrimas*

Bandymo metu gyvūnams duodami pašarai turi atitikti visus tos gyvūnų rūšies mitybos reikalavimus. Tais atvejais, kai bandomoji medžiaga dedama į pašarus, jų maistinė vertė gali sumažėti dėl bandomosios medžiagos sąveikos su pašaru. Į tokios sąveikos galimybę turėtų būti atsižvelgiama aiškinant bandymo rezultatus. Standartiniai laboratorinių gyvūnų pašarai gali būti naudojami neribojant geriamo vandens kiekio. Jei bandomoji medžiaga duodama su pašarais, juos renkantis turi būti užtikrinama, kad bandomąją medžiagą būtų galima tinkamai su jais sumaišyti. Maisto teršalai, kurie turi įtakos toksiniam poveikiui, neturėtų viršyti koncentracijų, dėl kurių rezultatai gali būti iškreipti.

**C. ALTERNATYVUS BANDYMAS**

Europos Sąjunga siekia vystyti ir tvirtinti alternatyvius metodus, kuriais galima gauti panašią informaciją kaip ir įprastais bandymais su gyvūnais, tačiau kuriems būtų naudojama mažiau gyvūnų, jiems būtų sukeliama mažiau skausmo arba būtų galima visiškai jų nenaudoti.

Kai tik tokie metodai įsigalioja, būtina apsvarstyti jų taikymą siekiant nustatyti medžiagų pavojingumą, jas vėliau klasifikuojant bei ženklinant ir vertinant medžiagos cheminę saugą.

**D. ĮVERTINIMAS IR AIŠKINIMAS**

Vertinant ir aiškinant gyvūnų ir *in vitro* bandymų rezultatus, reikia atsižvelgti į jų tiesioginės ekstrapoliacijos žmogui ribotumą, todėl gavus įrodymą apie medžiagos neigiamą poveikį žmonėms, jo turėtų pakakti bandymų su gyvūnais rezultatams patvirtinti.

**E. LITERATŪROS ŠALTINIAI**

Dauguma šių metodų sukurti vykdant OECD bandymų gairių programą ir turėtų būti atliekami pagal Geros laboratorinės praktikos principus, kad būtų užtikrintas kuo didesnis abipusis duomenų pripažinimas.

Papildomos informacijos galima rasti OECD gairėse nurodytuose šaltiniuose ir kitoje publikuotoje literatūroje.

B.1 bis. **ŪMUS TOKSIŠKUMAS PER VIRŠKINAMĄJĮ TRAKTĄ. FIKSUOTŲJŲ DOZIŲ METODAS**1. **METODAS**

Šis bandymų metodas atitinka OECD TG 420 (2001).

1.1. **ĮVADAS**

Taikant tradicinius metodus ūmus toksiškumas įvertinamas pagal gyvūno žūtį. Britų toksikologų draugija (*British Toxicology Society*) 1984 m. pasiūlė naują ūmaus toksiškumo bandymo būdą, pagrįstą kelių fiksuoto dydžio dozių davimu (1). Taikant šį būdą poveikio įrodymas nebėra tik gyvūnų žūtis; metodas pagrįstas aiškių toksiškumo požymių, kurie pasireiškia nuo kurios nors fiksuoto dydžio dozės iš dozių serijos, stebėjimu. Pasibaigus JK (2) ir tarptautinio (3) tinkamumo patvirtinimo bandymui *in vivo*, 1992 m. ši procedūra buvo patvirtinta kaip bandymo metodas. Vėliau, taikant matematinius modelius, daugelyje bandymų buvo įvertintos statistinės fiksuotų dozių metodikos savybės (4)(5)(6). Be to, atlikti *in vivo* ir modeliavimo bandymai įrodė metodikos atkuriamumą ir kad ją taikant naudojama mažiau gyvūnų, jiems sukeliama mažesnė kančios nei taikant tradicinius metodus ir pagal ją galima suklasifikuoti medžiagas panašiai, kaip tai būtų padaryta taikant kitus ūmaus toksiškumo bandymo metodus.

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

Metodo esmę sudaro tai, kad atliekant pagrindinį bandymą skiriamos vidutinio toksiškumo dozės ir išvengiama dozių, kurios sukeltų žūtį. Be to, nereikia skirti dozių, kurios, kaip žinoma, sukelia didelį skausmą ir kančią dėl esdinančio arba stipriai dirginančio poveikio. Gaištantys gyvūnai arba gyvūnai, kurie akivaizdžiai patiria skausmą arba kuriems pasireiškia didelės ir ilgalaikės kančios požymiai, turi būti humaniškai numarunami ir interpretuojant bandymo rezultatus laikomi atliekant bandymą žuvusiais gyvūnais. Sprendimo numarinti gaištantį arba stipriai kenčiantį gyvūną priėmimo kriterijai ir numatomos arba neišvengiamos žūties nustatymo rekomendacijos yra atskiro rekomendacinio dokumento objektas (8).

Taikant metodą gaunama informacijos apie medžiagos pavojingas savybes, todėl ją galima įvertinti ir klasifikuoti pagal Visuotinai suderintą ūmų toksinį poveikį sukeliančių cheminių medžiagų klasifikavimo sistemą (*Globally Harmonised System (GHS) for the classification of chemicals which cause acute toxicity*) (9).

Prieš bandymo pradžią bandymų laboratorija išnagrinėja visą turimą informaciją apie bandomąją medžiagą. Tokią informaciją sudaro medžiagos tapatumas ir cheminė struktūra, jos fizikinės ir cheminės savybės, visų kitų *in vitro* arba *in vivo* medžiagos toksiškumo bandymų rezultatai, 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. **APIBRĖŽTYS**

**Ūmus toksiškumas per virškinamąjį traktą** – neigiamas poveikis, kuris atsiranda gavus per virškinamąjį traktą vieną medžiagos dozę arba kelias dozes per 24 h.

**Uždelsta žūtis** – kai gyvūnas nenugaišta arba nepradedą gaišti per 48 h, bet nugaišta vėliau per 14 parų stebėjimo laikotarpį.

**Dozė** – gyvūnui duotas bandomosios medžiagos kiekis. Dozė išreiškiama bandomosios medžiagos mase bandomojo gyvūno masės vienetai (pvz., mg/kg).

**Akivaizdus toksiškumas** – bendrasis terminas, kuriuo apibūdinami tokie aiškūs toksiškumo požymiai, atsiradę gyvūnui (-ams) davus bandomosios medžiagos (pavyzdžiai pateikti (3)), kad galima numatyti, jog gyvūnui (-ams) davus kitą didžiausią fiksuotą dozę didesnei daliai gyvūnų pasireiškė didelio skausmo ir ilgalaikių didelių kančių požymiai, gaišimo būsenos požymiai (kriterijai pateikti rekomendaciniame dokumente dėl poveikio žmonėms (8)), arba tikėtina, kad jie nugaiš.

**GHS** – visuotinai suderinta cheminių medžiagų ir mišinių klasifikavimo sistema (*Globally Harmonised Classification System for Chemical Substances and Mixtures*). Ekonominio bendradarbiavimo ir plėtros organizacijos (OECD) (žmonių sveikata ir aplinka), JT pavojingų prekių gabenimo ekspertų komiteto (fizikinės ir cheminės savybės) ir Tarptautinės darbo organizacijos (ILO) (pranešimas apie pavojus) bendra veikla, koordinuojama pagal Bendrą organizacijų tinkamo cheminių medžiagų valdymo programą (*Interorganisation Programme for the Sound Management of Chemicals* (IOMC)).



**Neišvengiama žūtis** – kai gaišimo būseną arba žūtį numatoma anksčiau negu nustatytas kito planinio stebėjimo momentas. Grauzikams šios būsenos požymiai galėtų būti traukuliai, gulėjimas ant šono, gulėjimas horizontaliai ir drebulys. (Daugiau informacijos pateikta rekomendaciniame dokumente dėl poveikio žmonėms (8)).

**LD<sub>50</sub> (vidutinė mirtina dozė)** – statistiškai apskaičiuota per virškinamąjį traktą duodama medžiagos dozė, nuo kurios tikėtina gali žūti 50 % gyvūnų. LD<sub>50</sub> vertė išreiškiama bandomosios medžiagos mase bandomojo gyvūno masės vienetui (mg/kg).

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

**Gaišimo būseną** – būseną prieš žūtį arba neišvengiamos žūties, net jei gyvūnas gydomas, būseną. (Daugiau informacijos pateikta rekomendaciniame dokumente dėl poveikio žmonėms (8)).

**Numatoma žūtis** – klinikinių požymių, rodančių žūtį žinomu ateities momentu prieš eksperimento pabaigą, pvz., nesugebėjimas pasiekti vandens arba pašaro, buvimas. (Daugiau informacijos pateikta rekomendaciniame dokumente dėl poveikio žmonėms (8)).

### 1.3. BANDYMO METODO PRINCIPAS

Vienos lyties gyvūnų grupėms nuosekliai duodamos fiksuotos 5, 50, 300 ir 2 000 mg/kg dozės (išskirtiniu atveju galima apsvarstyti galimybę duoti papildomą fiksuotą 5 000 mg/kg dozę, žr. 1.6.2 skirsnį). Atsižvelgiant į orientacinį bandymą pasirenkama tokia pradinė dozė, kuri galėtų sukelti kai kuriuos toksiškumo požymius, bet kuri nebūtų sunkaus toksinio poveikio arba žūties priežastimi. Klinikiniai požymiai ir sąlygos, susijusios su skausmu, kančia ir neišvengiama žūtimi, išsamiai aprašytos atskirame OECD rekomendaciniame dokumente (8). Kitoms gyvūnų grupėms gali būti duodamos didesnės arba mažesnės fiksuotos dozės, atsižvelgiant į toksiškumo arba gaištamumo požymių buvimą arba nebuvimą. Ši procedūra tęsiama tol, kol nustatoma dozė, sukelianti aki-vaizdų toksiškumą arba ne daugiau kaip vieno gyvūno žūtį, arba kol nustatoma, kad net didžiausia dozė nesukelia jokio poveikio arba gyvūnai žūsta net nuo mažiausios dozės.

### 1.4. BANDYMO METODO APRAŠYMAS

#### 1.4.1. Gyvūnų rūšies pasirinkimas

Tinkamiausia grauzikų rūšis yra žiurkės, nors galima naudoti ir kitus grauzikus. Paprastai naudojamos patelės (7). Taip yra todėl, kad literatūros apie tipinius LD<sub>50</sub> bandymus analizė rodo, kad jautrumo skirtumai tarp lyčių yra maži, bet tais atvejais, kai jie yra, patelės dažniausiai yra šiek tiek jautresnės (10). Tačiau, jei giminingos struktūros cheminių junginių toksikologinės arba toksikokinetinės savybės rodo, kad jautresni gali būti patinai, turėtų būti naudojama ši lytis. Kai bandymai daromi su patiniais, pateikiamas tinkamas pagrindimas.

Bandomi sveiki, jauni, bet suaugę plačiai naudojamų laboratorinių rūšių gyvūnai. Patelės turi būti dar neturėjusios palikuonių ir neapvaisintos. Kiekvieno gyvūno amžius prieš duodant dozę turi būti nuo 8 iki 12 savaičių, o masė  $\pm$  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 ( $\pm$  3 °C). Nors santykinė oro drėgmė turėtų būti mažiausiai 30 % ir pageidautina ne didesnė kaip 70 %, išskyrus patalpos plovimo laiką, reikėtų siekti, kad ji būtų 50–60 %. Apšvietimas turi būti dirbtinis ir jo seka: 12 h šviesos ir 12 h tamsos. Gyvūnams šerti tinka įprastas laboratorinių gyvūnų pašaras, geriamojo vandens kiekis neribojamas. Gyvūnai gali būti laikomi grupėmis narveliuose, į grupes skirstant pagal jų gaunamą dozę, tačiau gyvūnų skaičius narvelyje neturi trukdyti aiškiai stebėti kiekvieną gyvūną.

#### 1.4.3. Gyvūnų ruošimas

Gyvūnai atrenkami atsitiktinai, ženklinami, kad būtų įmanoma identifikuoti kiekvieną gyvūną, ir prieš dozių davimo pradžią laikomi narveliuose mažiausiai 5 paras, kad galėtų priprasti prie laboratorijos sąlygų.

#### 1.4.4. Dozių ruošimas

Paprastai bandomoji medžiaga duodama tokio paties tūrio dozėmis, keičiama tik dozės preparato koncentracija. Tačiau jei reikia bandyti skystą galutinį produktą arba mišinį, paskesniai šios bandomosios medžiagos rizikos įvertinimui galbūt labiau tiktų neskiesta, t. y. pastovios koncentracijos, bandomoji medžiaga, to reikalauja ir kai kurios reglamentuojančios institucijos. Bet kuriuo atveju didžiausias duodamos dozės tūris neturi būti viršytas. Didžiausias skysčio tūris, kurį galima duoti vienu metu, priklauso nuo bandomo gyvūno dydžio.

Graužikams šis tūris paprastai turi būti ne didesnis kaip 1 ml/100g kūno masės, tačiau vandeninių tirpalų atveju galima duoti 2 ml/100g kūno masės. Kalbant apie dozuojamo preparato sudėtį, rekomenduojama naudoti, jei įmanoma, vandeninį tirpalą (suspensiją, emulsiją), toliau pirmenybė teikiama aliejiniam tirpalui (emulsijai, suspensijai) (pvz., kukurūzų aliejaus) ir tik po jų galimi kitų nešiklių tirpalai. Jei nešiklis ne vanduo, turi būti žinomos jo toksikologinės charakteristikos. Dozės turi būti ruošiamos prieš pat davimą, išskyrus kai preparato stabilumas naudojimo laikotarpiu yra žinomas ir laikomas priimtiniu.

## 1.5. BANDYMO EIGA

### 1.5.1. Dozavimas

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

Prieš duodant dozę gyvūnai nešeriami (pvz., žiurkės negauna pašaro, išskyrus vandenį, per naktį; pelės negauna pašaro, išskyrus vandenį, 3–4 h). Pasibaigus badavimo laikotarpiui, gyvūnai pasveriami ir duodama bandomoji medžiaga. Gavusios bandomosios medžiagos žiurkės gali būti nešeramos dar 3–4 h, pelės nešeramos 1–2 h. Jei dozė duodama dalimis tam tikrą laikotarpį, gyvūnus gali tekti šerti ir girdyti atsižvelgiant į laikotarpio trukmę.

### 1.5.2. Orientacinis bandymas

Orientacinio bandymo tikslas – nustatyti tinkamą pradinę pagrindinio bandymo dozę. Bandomoji medžiaga nuosekliai duodama atskiriems gyvūnams pagal 1 priedėlio diagramą. Orientacinis bandymas baigiamas, kai galima priimti sprendimą dėl pagrindinio bandymo pradinės dozės (arba jei gyvūnas žūsta esant mažiausiai fiksuotai dozei).

Orientacinio bandymo pradinė dozė pasirenkama iš 5, 50, 300 ir 2 000 mg/kg dozių kaip dozė, nuo kurios turėtų pasireikšti akivaizdus toksiškumas. Ji turi būti pagrįsta, jei įmanoma, *in vivo* ir *in vitro* duomenimis apie tą pačią cheminę medžiagą ir struktūriniu požiūriu giminingas chemines medžiagas. Neturint tokios informacijos, pradinė dozė yra 300 mg/kg.

Kiekvienam gyvūnui dozės duodamos ne dažniau kaip kas 24 h. Visi gyvūnai turėtų būti stebimi mažiausiai 14 parų.

Išimtiniais atvejais ir tik jei tai pagrįsta tam tikrais reguliavimo sumetimais, galima spręsti, ar skirti papildomą viršutinės ribos fiksuotą 5 000 mg/kg dydžio dozę (žr. 3 priedėlį). Dėl gyvūnų gerovės priežasčių neskatinama daryti bandymo taikant GHS 5 kategorijos intervalus (2 000–5 000 mg/kg) ir apie tokio bandymo būtinybę turėtų būti sprendžiama, kai yra didelė tikimybė, kad jo rezultatai yra tiesiogiai sietini su žmonių ar gyvūnų sveikatos arba aplinkos apsauga.

Tais atvejais, kai darant orientacinį bandymą žūsta gyvūnas, gavęs mažiausią fiksuotą dozę (5 mg/kg), įprasta bandymą nutraukti ir medžiagą priskirti GHS 1 kategorijai (kaip nurodyta 1 priedėlyje). Tačiau jei reikalingas tolesnis klasifikavimo patvirtinimas, gali būti atliekama tokia neprivaloma papildoma procedūra: 5 mg/kg dozė duodama antram gyvūnui. Jei šis antras gyvūnas žūsta, GHS 1 kategorija patvirtinama ir bandymas iš karto nutraukiamas. Jei antras gyvūnas išgyvena, 5 mg/kg dozę gauna ne daugiau kaip trys papildomi gyvūnai. Kadangi yra didelė žūties rizika, gyvūnų gerovei apsaugoti jie turi gauti šią dozę paeiliui. Laiko tarpo tarp dozės davimo kiekvienam gyvūnui turi pakakti nustatyti, ar pirmiau dozę gavęs gyvūnas turi galimybę išgyventi. Jei žūsta antras gyvūnas, dozių davimas iš karto nutraukiamas ir nei vienas papildomas gyvūnas dozės nebegauna. Kadangi žūvus antram gyvūnui (neatsižvelgiant į bandymo nutraukimo momentu panaudotų gyvūnų skaičių) rezultatas yra A (2 arba daugiau žūčių), taikoma 2 priedėlio klasifikavimo taisyklė esant 5 mg/kg fiksuotai dozei (1 kategorija, jei žuvo 2 arba daugiau gyvūnų, 2 kategorija, jei žuvo ne daugiau kaip 1 gyvūnas). Be to, 4 priedėlyje pateiktas klasifikavimo metodas pagal ES sistemą, taikytinas iki bus įgyvendinta nauja GHS.

### 1.5.3. Pagrindinis bandymas

#### 1.5.3.1. Gyvūnų skaičius ir dozių dydis

Veiksmai, kurių turi būti imamasi po bandymo su pradine doze, nurodyti 2 priedėlyje pateiktose schemose. Yra trys būdai: nutraukti bandymą ir priskirti medžiagą atitinkamai pavojaus klasei, bandyti esant didesnei fiksuotai dozei arba bandyti esant mažesnei fiksuotai dozei. Tačiau siekiant apsaugoti gyvūnus, darant pagrindinį bandymą nebus kartojama dozė, sukėlusį žūtį darant orientacinį bandymą (žr. 2 priedėlį). Patirtis rodo, kad labiausiai tikėtina, jog davus pradinę dozę medžiagą galima suklasifikuoti ir tolesnio bandymo nebereikia.

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

Laiko tarpą tarp kiekvieno dydžio dozių skyrimo lemia toksiškumo požymių atsiradimo pradžia, trukmė ir sunkumas. Kitos dozės davimas gyvūnams atidedamas tol, kol bus įsitikinta, kad išgyveno anksčiau dozę gavę gyvūnai. Rekomenduojamas 3 arba 4 parų laikotarpis tarp kiekvieno dydžio dozės, jei pririekia, uždelstam toksiniam poveikiui stebėti. Laiko tarpas pririekus gali būti keičiamas, pvz., jei gaunama reakcija, dėl kurios sunku priimti sprendimą.

Kai sprendžiama, ar skirti didžiausią fiksuotą 5 000 mg/kg dozę, reikėtų laikytis 3 priedėlyje aprašyto metodo (taip pat žr. 1.6.2 skirsnį).

#### 1.5.3.2. Ribinis bandymas

Ribinis bandymas visų pirma atliekamas tais atvejais, kai bandytojas turi informacijos, rodančios, kad bandomoji medžiaga greičiausiai yra netoksiška, t. y. toksiškumas pasireiškia esant didesnėms nei reglamentuojamos ribinėms dozėms. Informacijos apie bandomosios medžiagos toksiškumą galima gauti pasinaudojus žiniomis apie panašius bandytus junginius arba panašius bandytus mišinius arba produktus, atsižvelgiant į toksikologiškai reikšmingų komponentų tapatumą ir procentinę dalį. Tais atvejais, kai informacijos apie medžiagos toksiškumą yra mažai arba jos išvis nėra, arba kai ta informacija leidžia manyti, kad bandomoji medžiaga yra toksiška, turi būti atliekamas pagrindinis bandymas.

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

## 1.6. STEBĖJIMAI

Kiekvienas dozę gavęs gyvūnas stebimas bent vieną kartą per pirmąsias 30 min. ir periodiškai per pirmąsias 24 h, skiriant ypatingą dėmesį pirmosioms keturioms valandoms, o vėliau kartą per dieną visas 14 parų, išskyrus atvejus, kai gyvūnams reikia nutraukti bandymą ir humaniškai numarinti dėl gyvūnų gerovės priežasčių arba kai jie nugaišta. Tačiau stebėjimo trukmė neturi būti griežtai fiksuojama. Ji nustatoma pagal toksines reakcijas, sveikimo laikotarpio pradžią ir trukmę, taigi pririekus ji gali būti pratęsta. Svarbus yra toksiškumo požymių atsiradimo ir išnykimo momentas, ypač jei uždelsto toksiškumo požymių atsiradimo tendencija (11). Visi stebėjimai sistemingai užrašomi, apie kiekvieną gyvūną atskirai.

Jei gyvūnams ir toliau pasireiškia toksiškumo požymiai, reikia stebėti papildomai. Reikia stebėti odos ir kailio, akių ir gleivinės pasikeitimus, be to kvėpavimo, kraujo, autonominės ir centrinės nervų sistemų, somatomotorinio aktyvumo ir elgesio pasikeitimus. Ypač reikia stebėti, ar nepasireiškia drebulys, traukuliai, viduriavimas, mieguistumas, miego ir komos būsenos, ar neteka seilės. Reikėtų atsižvelgti į principus ir kriterijus, apibendrintus Rekomendaciniame dokumente dėl poveikio žmonėms (8). Gaištantys gyvūnai ir gyvūnai, kurie patiria didelius skausmus arba kuriems pasireiškia ilgalaikiai sunkių kančių požymiai, turėtų būti humaniškai numarinti. Kai gyvūnai numarunami dėl gyvūnų gerovės priežasčių arba randami negyvi, žūties laikas užrašomas kuo tiksliau.

#### 1.6.1. Kūno masė

Kiekvieno gyvūno masė nustatoma prieš pat bandomosios medžiagos davimą ir vėliau – mažiausiai kas savaitę. Turi būti apskaičiuotas ir užrašytas masės pokytis. Pasibaigus bandymui, išlikę gyvūnai pasveriami ir humaniškai numarunami.

**1.6.2. Patologija**

Visiems bandomiesiems gyvūnams (įskaitant nugaišusius per bandymą arba pašalintus iš bandymo dėl gyvūnų gerovės priežasčių) daroma bendroji nekroskopija. Aprašomi visi dideli kiekvieno gyvūno patologiniai pokyčiai. Gyvūnams, kurie po dozės gavimo išgyveno 24 h arba ilgiau, galima būtų daryti mikroskopinį organų, turinčių akivaizdžių patologinių pokyčių, tyrimą, kadangi jis gali suteikti naudingos informacijos.

**2. DUOMENYS**

Turi būti pateikiami atskiri duomenys apie kiekvieną gyvūną. Be to, visi duomenys apibendrinami lentelėse, kuriose nurodomas kiekvienos bandymo grupės gyvūnų skaičius, toksiškumo požymių turinčių gyvūnų skaičius, darant bandymą žuvusių arba dėl gyvūnų gerovės priežasčių numarintų gyvūnų skaičius, atskirų gyvūnų žūties laikas, toksinio poveikio aprašymas ir eiga, grįžtamumas, nekroskopijos duomenys.

**3. ATASKAITOS RENGIMAS****3.1. BANDYMO ATASKAITA**

Bandymo ataskaitoje turi būti pateikta ši informacija, jei taikoma:

Bandomoji medžiaga:

- fizinė būsena, grynumas ir, jei svarbu, fizikinės ir cheminės savybės (įskaitant izomerizavimą),
- tapatumas, įskaitant CAS numerį.

Nešiklis (jei taikoma):

- nešiklio pasirinkimo pagrindimas, jei tai ne vanduo.

Bandomieji gyvūnai:

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

Bandymo sąlygos:

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

Rezultatai:

- kiekvieno gyvūno reakcijos duomenų ir dozės dydžio lentelės (t. y. gyvūnų, kuriems pasireiškia toksiškumo požymiai, įskaitant nugaišimą, poveikio tipą, sunkumą ir trukmę),

- kūno masės ir jos kitimo lentelės,
- kiekvieno gyvūno masė dozės davimo dieną, vėliau kas savaitę ir žūties arba numarinimo dieną,
- žūties data ir laikas, jei tai įvyksta prieš planinį numarinimą,
- toksiškumo požymių kiekvienam gyvūnui atsiradimas ir jų eiga, taip pat grįžtamumas kiekvieno gyvūno atveju,
- kiekvieno gyvūno nekroskopijos ir histopatologiniai duomenys, jei yra.

Rezultatų aptarimas ir aiškinimas.

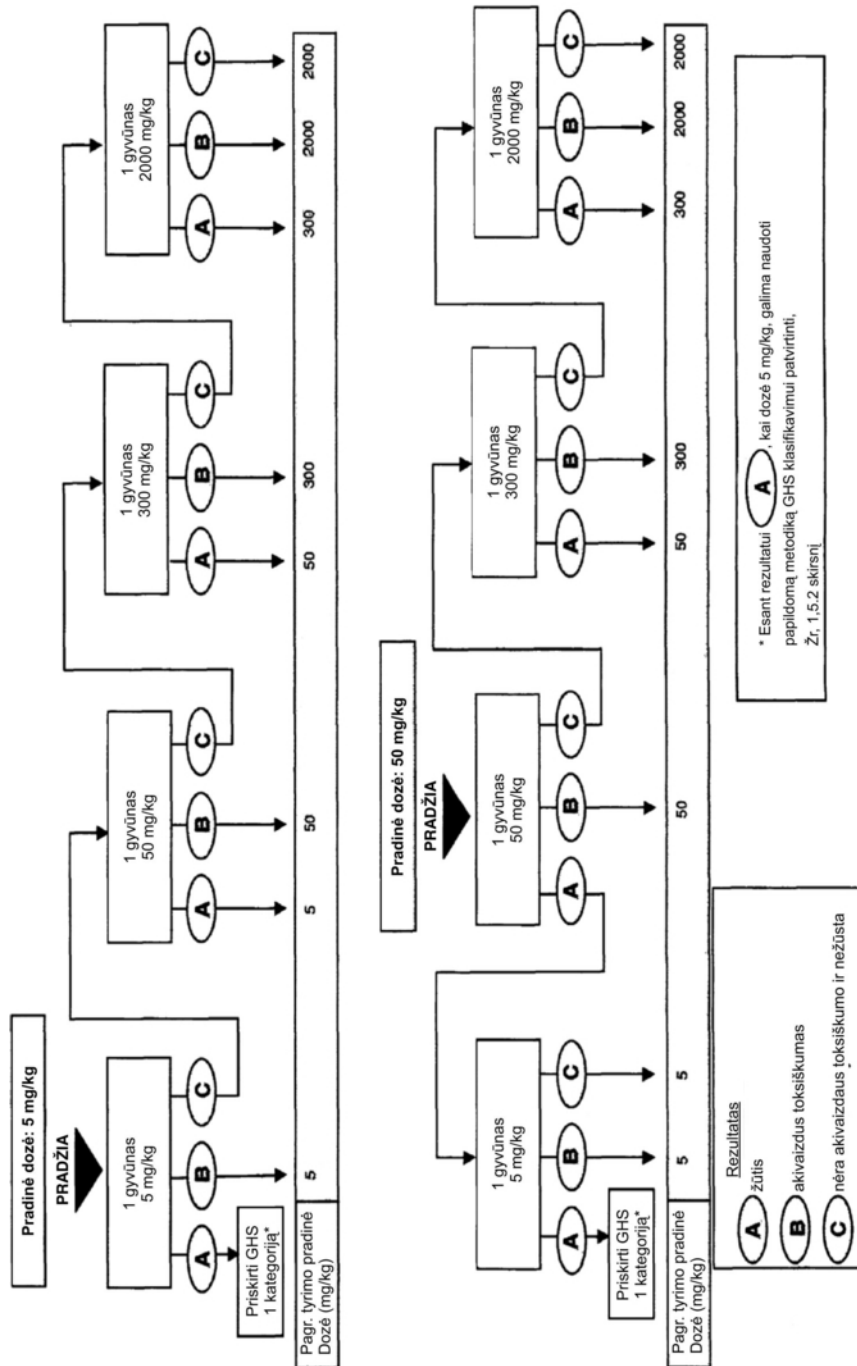
Išvados.

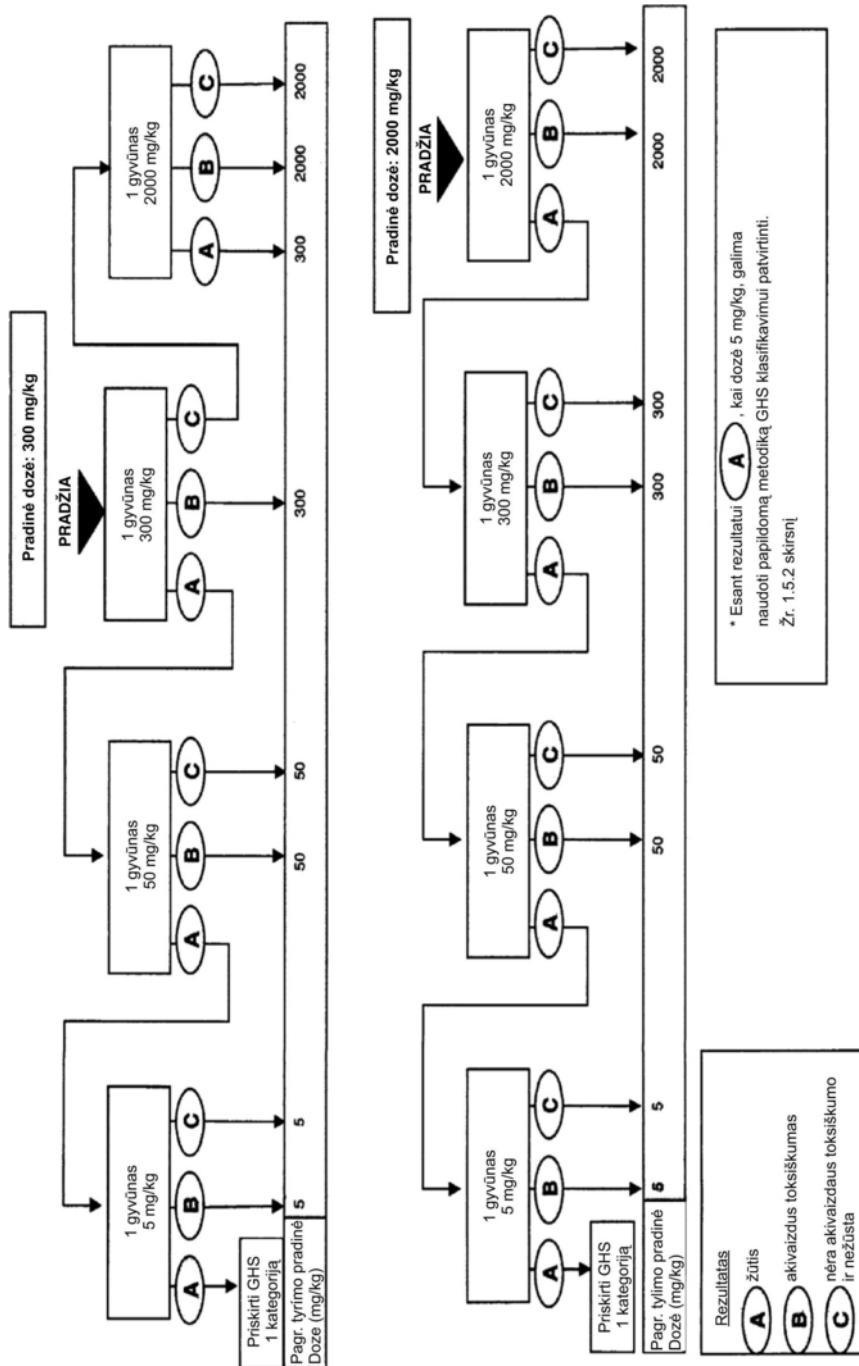
#### 4. NUORODOS

- 1) British Toxicology Society Working Party on Toxicity (1984). Special report: a new approach to the classification of substances and preparations on the basis of their acute toxicity. *Human Toxicol.*, 3, p. 85–92.
- 2) Van den Heuvel, M.J., Dayan, A.D. and Shillaker, R.O., (1987) Evaluation of the BTS approach to the testing of substances and preparations for their acute toxicity. *Human Toxicol.*, 6, p. 279–291.
- 3) Van den Heuvel, M.J., Clark, D.G., Fielder, R.J., Koundakjian, P.P., Oliver, G.J.A., Pelling, D., Tomlinson, N.J. and Walker, A.P., (1990) The international validation of a fixed-dose procedure as an alternative to the classical LD<sub>50</sub> 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.
- 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, L., Goddard, M., Segal, L., Springer, J.A. and Myers, R.C., (1995) Comparison of the Up-and-Down, Conventional LD<sub>50</sub>, 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. 3<sup>rd</sup> Edition. A.W. Hayes, Editor. Raven Press Ltd. New York, USA.

1 PRIEDĖLIS

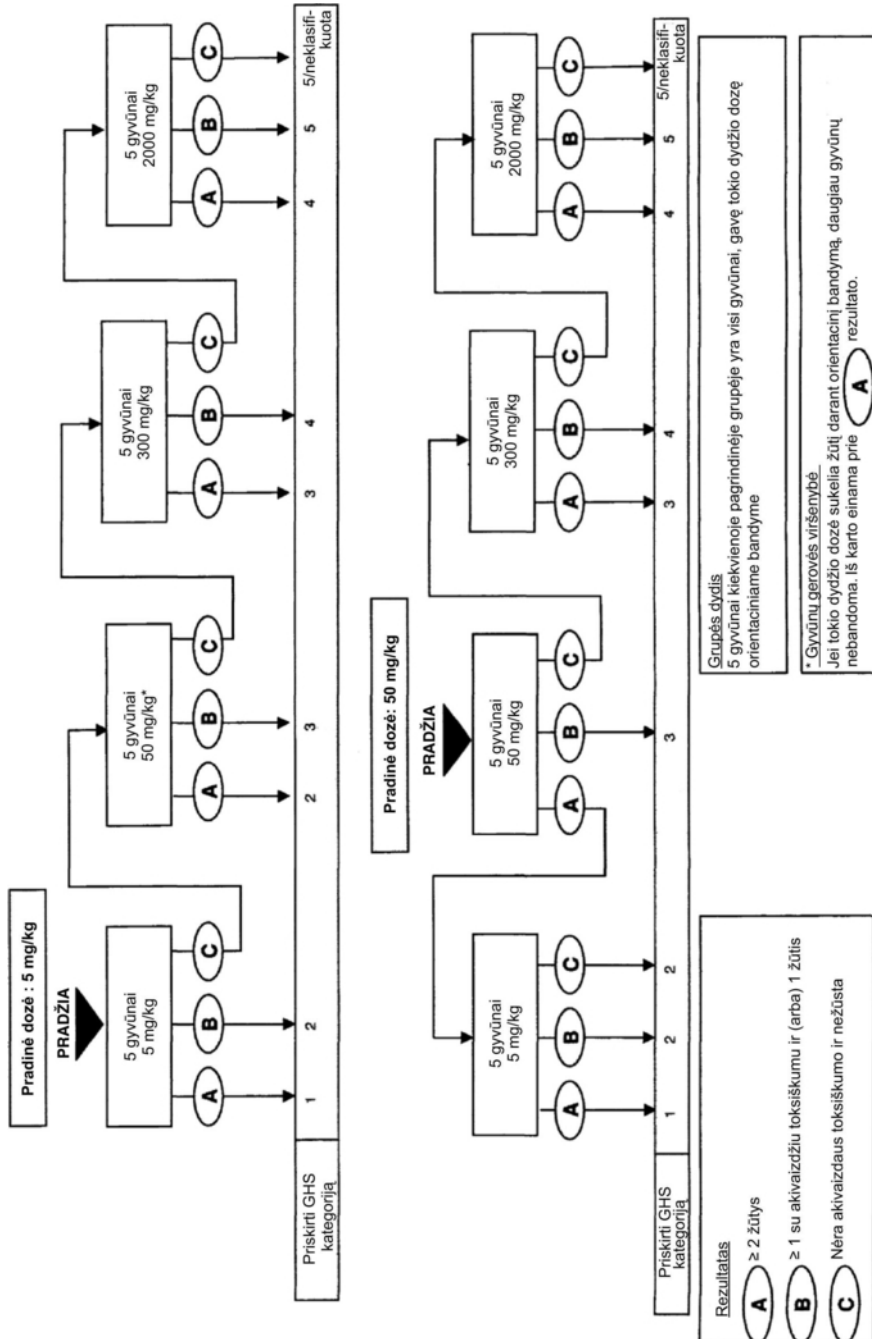
ORIENTACINIO BANDYMO SCHEMA



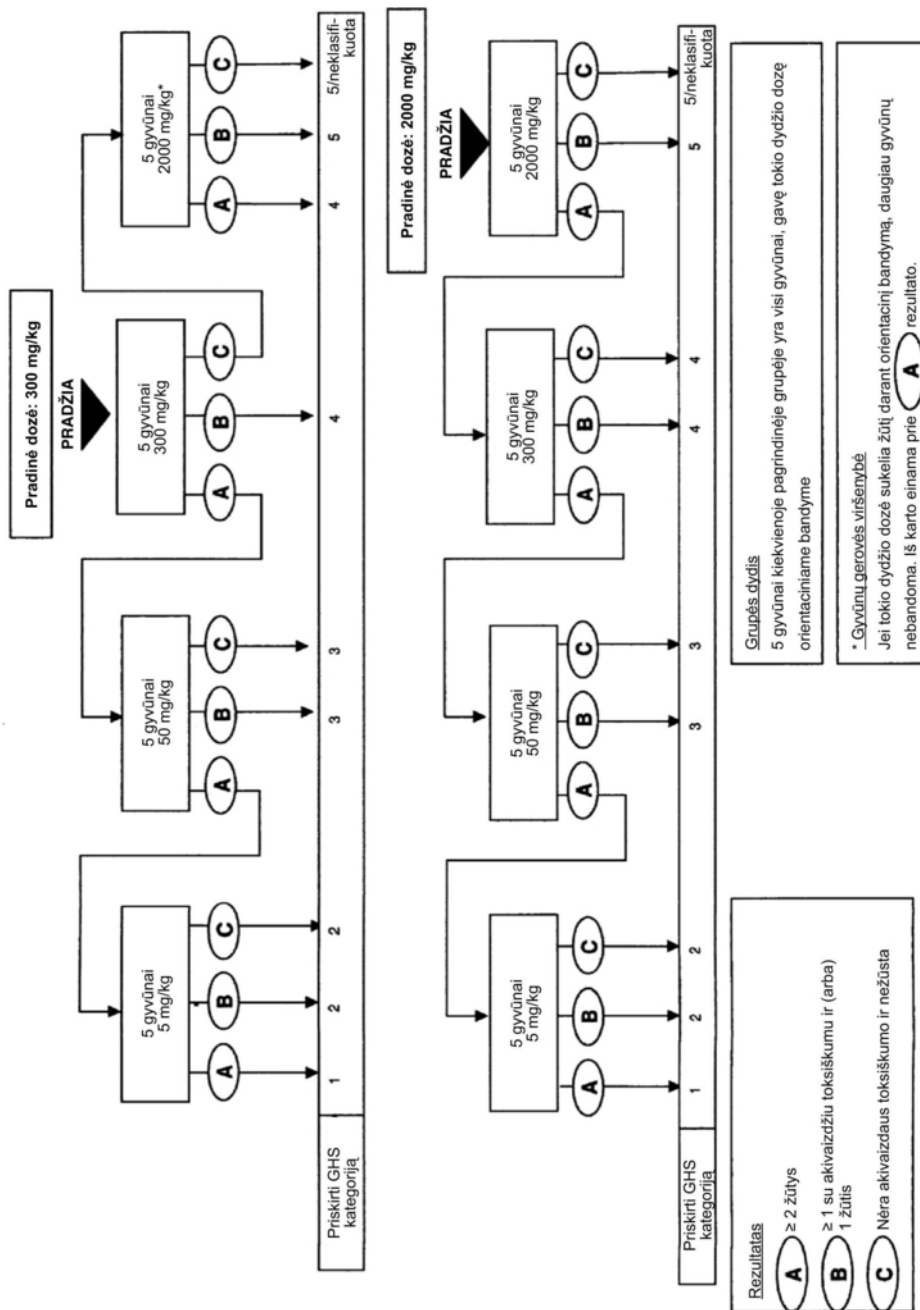


2 PRIEDĖLIS

PAGRINDINIO BANDYMO SCHEMA







## 3 PRIEDĖLIS

**BANDOMŪJŲ MEDŽIAGŲ, KURIŲ TIKĖTINOS LD<sub>50</sub> VERTĖS YRA DIDESNĖS NEGU 2 000 MG/KG, KLASIFIKAVIMO KRITERIJAI NEDARANT BANDYMO**

5 pavojaus kategorijos kriterijai yra apibrėžti, kad būtų galima identifikuoti bandomąsias medžiagas, kurių ūmaus toksiškumo pavojus yra palyginti mažas, tačiau kurios esant tam tikroms aplinkybėms gali būti pavojingos pažeidžiamoms populiacijoms. Tikėtina, kad šių medžiagų LD<sub>50</sub> per virškinimo traktą arba odą yra 2 000–5 000 mg/kg arba ekvivalentinė dozė, kai medžiagos patenka kitais būdais. Bandomosios medžiagos galėtų būti priskirtos pavojaus kategorijai, apibrėžtai 2 000 mg/kg < LD<sub>50</sub> < 5 000 mg/kg (5 kategorija pagal GHS), šiais atvejais:

- a) jei būtų priskirtos šiai kategorijai pagal kurią nors iš 2 priedėlio bandymo schemų, remiantis gaištamumo dažnumu;
- b) jei jau yra patikimų duomenų, rodančių, kad LD<sub>50</sub> yra 5 kategorijos verčių intervale, arba kiti bandymai su gyvūnais arba toksinis poveikis žmonėms rodo ūmaus tipo poveikį žmonių sveikatai;
- c) gaunant duomenis ekstrapoliavimo, įvertinimo arba matavimo būdu, jei priskyrimas didesnio pavojaus klasei nepagrįstas ir
  - yra patikimos informacijos, rodančios didelį toksinį poveikį žmonėms, arba
  - pastebimas tam tikras gaištamumas, kai bandymas atliekamas duodant dozes per virškinimo traktą, siekiančias 4 kategorijos vertes, arba
  - jei tęsiant bandymus iki 4 kategorijos verčių, ekspertų sprendimu patvirtinami reikšmingi klinikiniai toksiškumo požymiai, išskyrus viduriavimą, pasišiaušusius plaukus arba nesveiko gyvūno išvaizdą, arba
  - jei ekspertų sprendimu patvirtinama patikima informacija, rodanti galimą reikšmingą ūmų poveikį darant kitus bandymus su gyvūnais.

**BANDYMAS ESANT DIDESNĖMS NEGU 2 000 MG/KG DOZĖMS**

Išimtiniais atvejais, ir tik norint įvykdyti konkrečius kontrolės institucijų reikalavimus, galima spręsti, ar skirti papildomą viršutinės ribos fiksuotą 5 000 mg/kg dydžio dozę. Pripažįstant būtinumą apsaugoti gyvūnų gerovę, bandymas skiriant 5 000 mg/kg neskatinamas ir apie tokio bandymo būtinybę turėtų būti sprendžiama, kai yra didelė tikimybė, kad jo rezultatai yra tiesiogiai sietini su žmonių arba gyvūnų sveikatos apsauga (9).

**Orientacinis bandymas**

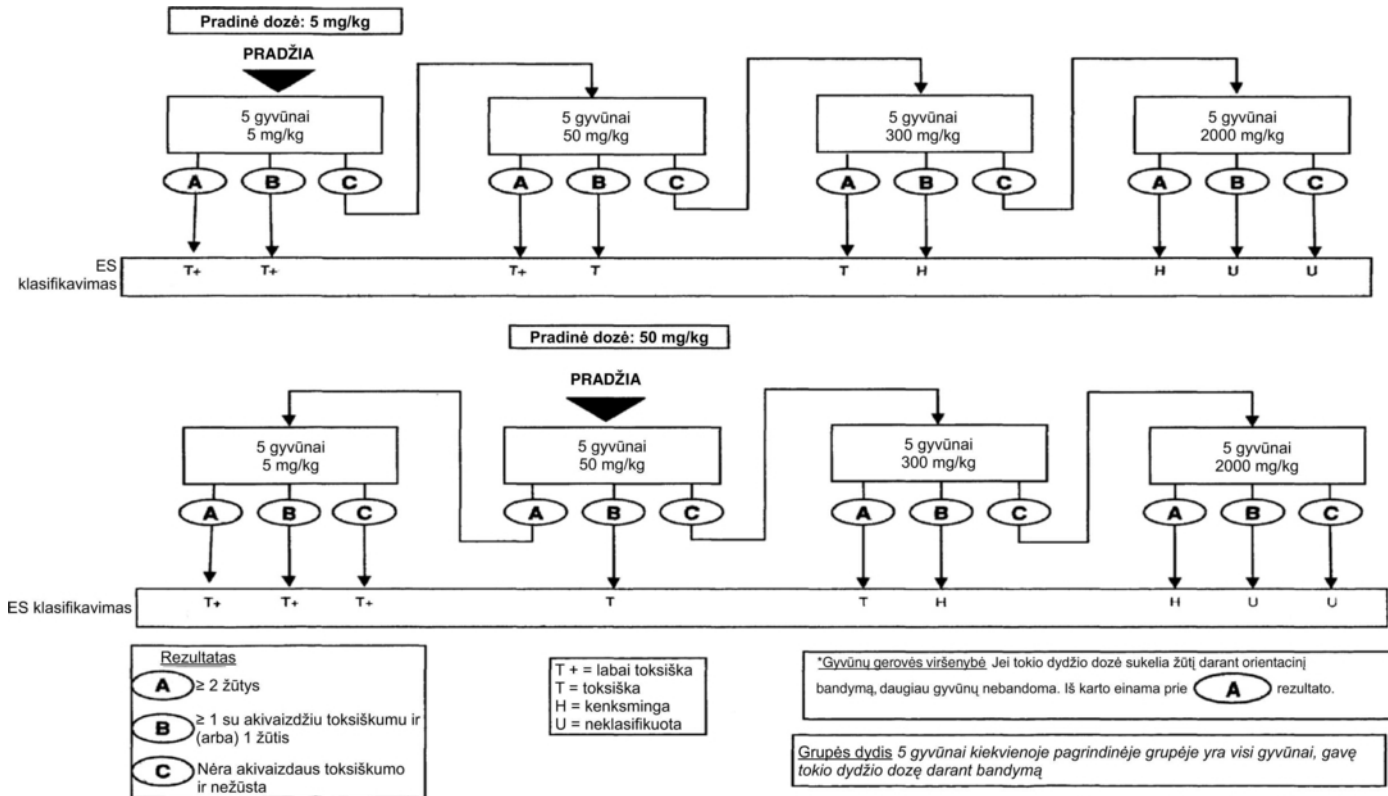
Sprendimo priėmimo taisyklės, taikomos 1 priedėlyje pateiktai nuosekliai procedūrai, išplečiamos, kad būtų galima įtraukti 5 000 mg/kg dozę. Taigi kai skiriama orientacinio bandymo pradinė 5 000 mg/kg dozė, gavus A rezultatą (žūtis), reikės daryti bandymą su antru gyvūnu, jam skiriant 2 000 mg/kg; gavus B ir C rezultatus (akivaizdus toksiškumas arba jokie toksiškumo), pradinė pagrindinio bandymo dozė gali būti 5 000 mg/kg. Panašiai, jei skiriama kita nei 5 000 mg/kg pradinė dozė, bandymas bus tęsiamas iki 5 000 mg/kg, jei esant 2 000 mg/kg dozei gaunti B arba C rezultatai; jei esant 5 000 mg/kg gautas A rezultatas, pagrindinio bandymo pradinė dozė yra 2 000 mg/kg, o gavus B ir C rezultatus, pagrindinio bandymo pradinė dozė yra 5 000 mg/kg.

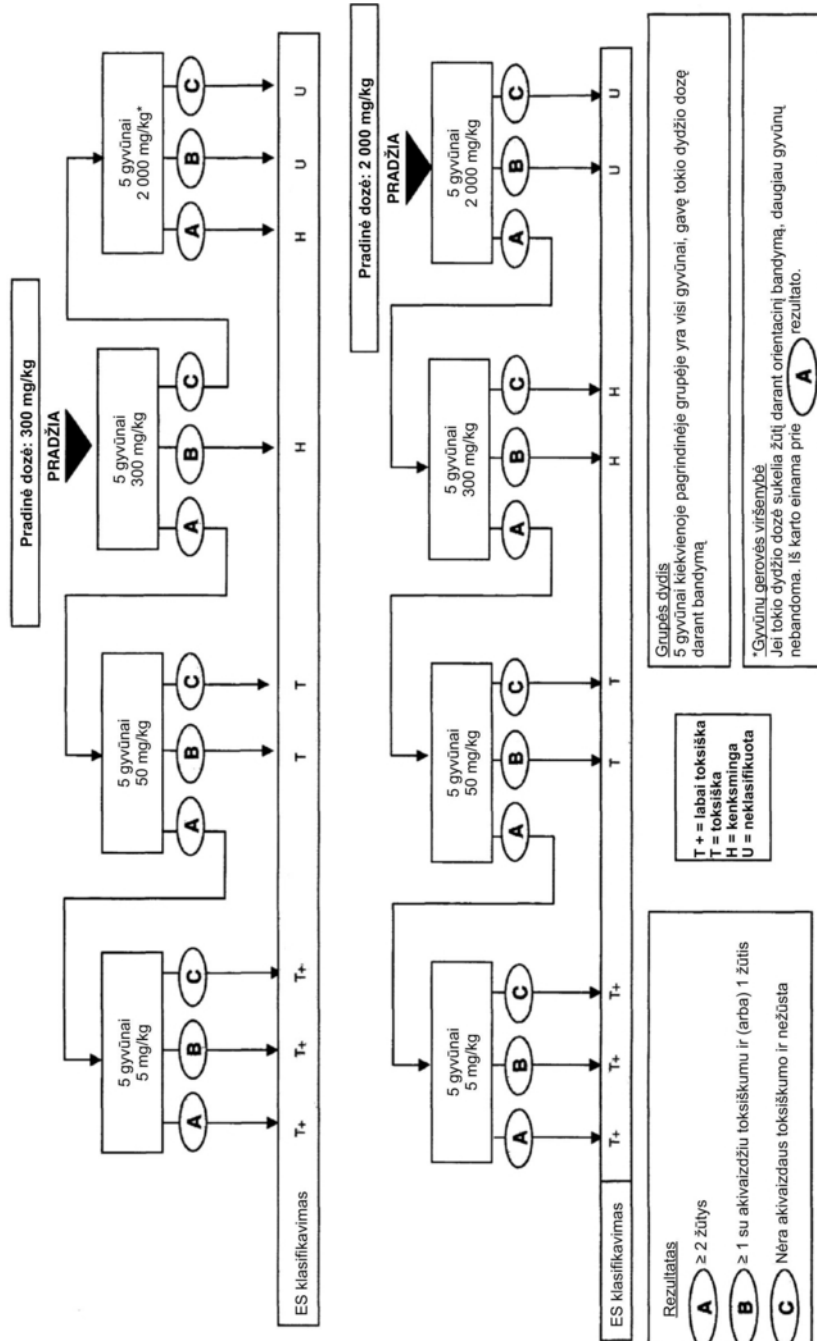
**Pagrindinis bandymas**

Sprendimo priėmimo taisyklės, taikomos 2 priedėlyje pateiktai nuosekliai procedūrai, išplečiamos, kad būtų galima įtraukti 5 000 mg/kg dozę. Taigi kai skiriama pagrindinio bandymo pradinė 5 000 mg/kg dozė, gavus A rezultatą (≥ 2 žūtys) reikės daryti 2 grupės bandymą, jai skiriant 2 000 mg/kg; gavus B rezultatą (akivaizdus toksiškumas ir (arba) ≤ 1 žūtis) arba C (jokio toksiškumo), medžiaga nebus klasifikuojama pagal GHS. Panašiai, jei naudojama kita nei 5 000 mg/kg pradinė dozė, bandymas bus tęsiamas iki 5 000 mg/kg, jei esant 2 000 mg/kg dozei gaunamas C rezultatas; jei esant 5 000 mg/kg dozei gaunamas A rezultatas, medžiaga priskiriama GHS 5 kategorijai, o gavus B arba C rezultatus, medžiaga pagal GHS neklasifikuojama.

BANDYMŲ METODAS B.1 bis.

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





B.1 tris. **ŪMUS TOKSIŠKUMAS PER VIRŠKINAMĄJĮ TRAKTĄ. ŪMAUS TOKSIŠKUMO KLASĖS METODAS**1. **METODAS**

Šis bandymo metodas atitinka OECD TG 423 (2001)

1.1. **ĮVADAS**

Šiame bandyme taikomas ūmaus toksiškumo klasės metodas (1) – tai nuosekli procedūra, pagal kurią vienai pakopai naudojami 3 vienos lyties gyvūnai. Atsižvelgiant į gaištamumą ir (arba) gyvūno gaišimo būseną, vidutiniškai gali prireikti 2–4 pakopų, kad būtų galima spręsti apie bandomosios medžiagos ūmų toksiškumą. Ši metodika yra 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 suklasifikuoti ir įvertinti jos pavojingumą. 1996 m. priimto metodo tinkamumas buvo plačiai patvirtintas nacionaliniu (6) ir tarptautiniu mastu (7) darant *in vivo* bandymus ir lyginant su literatūroje pateiktais LD<sub>50</sub> duomenimis.

Rekomendacijas dėl nurodytam tikslui tinkamiausio bandymų metodo pasirinkimo galima rasti Ūmaus toksiškumo per virškinamąjį traktą bandymo rekomendaciniame dokumente (8). Be to, šiame rekomendaciniame dokumente yra papildomos informacijos apie B.1 tris bandymo metodo taikymą ir aiškinimą.

Nereikia duoti dozių, jei žinoma, kad jos 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 numarunami ir interpretuojant bandymo rezultatus laikomi darant bandymą žuvusiais gyvūnais. Sprendimo numarinti gaištantį arba stipriai kenčiantį gyvūną priėmimo kriterijai ir numatomos arba neišvengiamos žūties nustatymo rekomendacijos yra atskiro rekomendacinio dokumento objektas (9).

Metode naudojami iš anksto nustatyto dydžio dozės, o rezultatai leidžia medžiagą įvertinti ir ją suklasifikuoti pagal Visuotinai suderintą ūmų toksinį poveikį sukeliančių cheminių medžiagų klasifikavimo sistemą (*Globally Harmonised System (GHS) for the classification of chemicals which cause acute toxicity*) (10).

Iš esmės šis metodas nėra skirtas tikslioms LD<sub>50</sub> vertėms apskaičiuoti, bet juo galima nustatyti apibrėžtus žūtį sukeliančių dozių intervalus, kadangi tokio bandymo tikslas ir yra nustatyti, ar dalis gyvūnų žūsta. Šiuo metodu galima nustatyti LD<sub>50</sub> vertę tik tais atvejais, kai mažiausiai dvejų dozių sukeliamas gaištamumas yra didesnis kaip 0 % ir mažesnis kaip 100 %. Kai skiriamos iš anksto pasirinkto dydžio dozės neatsižvelgiant į bandomąją medžiagą, o klasifikavimas tiesiogiai siejamas su stebimų skirtingos būsenos gyvūnų skaičiumi, laboratorijoms dėdėja galimybė pasiekti suderinamų ir atkartojamų rezultatų.

Prieš bandymo pradžią bandymų laboratorija išnagrinėja visą turimą informaciją apie bandomąją medžiagą. Tokią informaciją sudaro medžiagos tapatumas ir cheminė struktūra, jos fizikinės ir cheminės savybės, visų kitų *in vitro* arba *in vivo* medžiagos toksiškumo bandymų rezultatai, giminingos struktūros medžiagų toksikologiniai duomenys ir numatomas (-i) medžiagos naudojimo būdas (-ai). Ši informacija yra būtina siekiant įsitikinti, kad bandymas reikalingas žmonių sveikatos apsaugos tikslais, ir padeda pasirinkti tinkamą pradinę dozę.

1.2. **APIBRĖŽTYS**

**Ūmus toksiškumas per virškinamąjį traktą** – neigiamas poveikis, kuris atsiranda gavus per virškinamąjį traktą vieną medžiagos dozę arba kelias dozes per 24 h.

**Uždelsa žūtis** – kai gyvūnas nenugaišta arba nepradedą gaišti per 48 h, bet nugaišta vėliau per 14 parų stebėjimo laikotarpį.

**Dozė** – gyvūnui duotas bandomosios medžiagos kiekis. Dozė išreiškiama bandomosios medžiagos mase bandomojo gyvūno masės vienetui (pvz., mg/kg)

**GHS** – visuotinai suderinta cheminių medžiagų ir mišinių klasifikavimo sistema (*Globally Harmonised Classification System for Chemical Substances and Mixtures*). Ekonominio bendradarbiavimo ir plėtros organizacijos (OECD) (žmonių sveikata ir aplinka), JT pavojingų prekių gabenimo ekspertų komiteto (fizikinės ir cheminės savybės) ir Tarptautinės darbo organizacijos (ILO) (pranešimas apie pavojus) bendra veikla, koordinuojama pagal Bendrą organizacijų tinkamą cheminių medžiagų valdymo programą (*Interorganisation Programme for the Sound Management of Chemicals* (IOMC))

**Neišvengiama žūtis** – kai gaišimo būseną arba žūtį numatoma anksčiau negu nustatytas kito planinio stebėjimo momentas. Grauzikams šios būsenos požymiai galėtų būti traukuliai, gulėjimas ant šono, gulėjimas horizontaliai ir drebulys. (Daugiau informacijos pateikta rekomendaciniame dokumente dėl poveikio žmonėms (9)).

**LD<sub>50</sub> (vidutinė mirtina dozė)** – statistškai apskaičiuota per virškinamąjį traktą duodama medžiagos dozė, nuo kurios tikėtina gali žūti 50 % gyvūnų. LD<sub>50</sub> vertė išreiškiama bandomosios medžiagos mase bandomojo gyvūno masės vienetui (mg/kg).

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

**Gaišimo būseną** – būseną prieš žūtį arba neišvengiamos žūties, net jei gyvūnas gydomas, būseną. (Daugiau informacijos pateikta rekomendaciniame dokumente dėl poveikio žmonėms (9)).

**Numatoma žūtis** – klinikinių požymių, rodančių žūtį žinomu ateities momentu prieš eksperimento pabaigą, pvz., nesugebėjimas pasiekti vandens arba pašaro, buvimas. (Daugiau informacijos pateikta rekomendaciniame dokumente dėl poveikio žmonėms (9)).

### 1.3. BANDYMO METODO PRINCIPAS

Šio bandymo esmė sudaro nuoseklusis metodas, pagal kurį vienai pakopai naudojant mažiausią įmanomą gyvūnų skaičių gaunama pakankamai informacijos apie bandomosios medžiagos ūmų toksiškumą, kad būtų galima ją klasifikuoti. Bandymo gyvūnų grupė per virškinamąjį traktą gauna vieną iš nustatytų bandomosios medžiagos dozių. Medžiaga bandoma taikant nuoseklųjį metodą, kiekvienai pakopai naudojant po tris vienos lyties gyvūnus (paprastai patelės). Tai, ar junginio dozė gavę gyvūnai nugaišta per vieną pakopą, lemia, kokia yra tolesnė pakopa, t. y.:

- toliau bandyti nereikia,
- duoti tokią pat dozę dar trims gyvūnams,
- trims papildomiems gyvūnams duoti kitą didesnę arba mažesnę dozę.

Bandymo metodika išsamiai aprašyta 1 priedėlyje. Metodas leidžia spręsti, ar bandomąją medžiagą priskirti vienai iš toksiškumo klasių, apibrėžtų fiksuotomis LD<sub>50</sub> intervalo ribinėmis vertėmis.

### 1.4. METODO APRĄŠYMAS

#### 1.4.1. Gyvūnų rūšies pasirinkimas

Tinkamiausia grauzikų rūšis yra žiurkės, nors galima naudoti ir kitus grauzikus. Paprastai naudojamos patelės (9). Taip yra todėl, kad literatūros apie tipinius LD<sub>50</sub> bandymus analizė rodo, kad jautrumo skirtumai tarp lyčių yra maži, bet tais atvejais, kai jie yra, patelės dažniausiai yra šiek tiek jautresnės (11). Tačiau jei giminingos struktūros cheminių junginių toksikologinės arba toksikokinetinės savybės rodo, kad jautresni gali būti patinai, turėtų būti naudojama ši lytis. Kai bandymai daromi su patiniais, turėtų būti pateiktas atitinkamas pagrindimas.

Bandomi sveiki, jauni, bet suaugę plačiai naudojamų laboratorinių rūšių gyvūnai. Patelės turi būti neturėjusios palikuonių ir neapvaisintos. Kiekvieno gyvūno amžius prieš skiriant dozę turėtų būti nuo 8 iki 12 savaičių, o masė ± 20 % tikslumu turi atitikti anksčiau dozę gavusių gyvūnų vidutinę masę.

#### 1.4.2. Laikymo ir šėrimo sąlygos

Bandomų gyvūnų patalpos temperatūra turi būti 22 °C (± 3 °C). Nors santykinė oro drėgmė turėtų būti mažiausiai 30 % ir pageidautina ne didesnė kaip 70 %, išskyrus patalpos plovimo laiką, reikėtų siekti, kad ji būtų 50–60 %. Apšvietimas turi būti dirbtinis ir jo seka: 12 h šviesos ir 12 h tamsos. Gyvūnams šerti tinka įprastas laboratorinių gyvūnų pašaras, geriamojo vandens kiekis neribojamas. Gyvūnai gali būti laikomi grupėmis narveliuose, į grupes skirstant pagal jų gaunamą dozę, tačiau gyvūnų skaičius narvelyje neturi trukdyti aiškiai stebėti kiekvieną gyvūną.

#### 1.4.3. Gyvūnų ruošimas

Gyvūnai atrenkami atsitiktinai, ženklunami, kad būtų įmanoma identifikuoti kiekvieną gyvūną, ir prieš dozių davimo pradžią laikomi narveliuose mažiausiai 5 paras, kad priprastų prie laboratorijos sąlygų.

#### 1.4.4. Dozių ruošimas

Paprastai bandomoji medžiaga duodama tokio paties tūrio dozėmis, keičiama tik preparato koncentracija. Tačiau jei reikia bandyti skystą galutinį produktą arba mišinį, paskesniai 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 turi būti ne didesnis kaip 1 ml/100g kūno masės, tačiau vandeninių tirpalų atveju galima duoti 2 ml/100g kūno masės. Kalbant apie dozuojamą preparato sudėtį, rekomenduojama naudoti, jei įmanoma, vandeninį tirpalą (suspensiją, emulsiją), toliau pirmenybė teikiama aliejiniam tirpalui (emulsijai, suspensijai) (pvz., kukurūzų aliejaus) ir tik po jų galimi kitų nešiklių tirpalai. Jei nešiklis yra ne vanduo, turi būti žinomos jo toksikologinės charakteristikos. Dozės turi būti ruošiamos prieš pat davimą, išskyrus kai preparato stabilumas naudojimo laikotarpiu yra žinomas ir laikomas priimtiniu.

#### 1.5. BANDYMO EIGA

##### 1.5.1. Dozavimas

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

Prieš duodant dozę gyvūnai nešeriami (pvz., žiurkės negauna pašaro, išskyrus vandenį, per naktį; pelės negauna pašaro, išskyrus vandenį, 3–4 h). Pasibaigus badavimo laikotarpiui, gyvūnai pasveriami ir duodama bandomoji medžiaga. Gavusios bandomosios medžiagos žiurkės gali būti nešeriamos dar 3–4 h, pelės nešeriamos 1–2 h. Jei dozė duodama dalimis per tam tikrą laikotarpį, gyvūnus gali tekti šerti ir girdyti atsižvelgiant į laikotarpio trukmę.

##### 1.5.2. Gyvūnų skaičius ir dozių dydis

Kiekvienai pakopai naudojami trys gyvūnai. Dozė, kuri turi būti naudojama kaip pradinė dozė, pasirenkama iš keturių fiksuotų dydžių: 5, 50, 300 ir 2 000 mg/kg kūno masės. Kaip pradinė turėtų būti pasirinkta tokia dozė, nuo kurios tikrai nugaištų kai kurie dozę gavę gyvūnai. Schemose, pateiktose 1 priedėlyje, aprašyta procedūra, kurią reikėtų taikyti kiekvienai pradinei dozei. Be to, 4 priedėlyje pateiktas klasifikavimo metodas pagal ES sistemą, taikytinas iki bus įgyvendinta nauja GHS.

Kai turima informacija leidžia manyti, kad gyvūnai neturėtų nugaišti nuo didžiausios pradinės dozės (2 000 mg/kg kūno masės), reikėtų daryti ribinį bandymą. Jei informacijos apie bandomąją medžiagą nėra, dėl gyvūnų gerovės priešasčių pradine doze reikėtų pasirinkti 300 mg/kg kūno masės.

Laiko tarpą tarp kiekvieno dydžio dozių davimo lemia toksiškumo požymių atsiradimo pradžia, trukmė ir sunkumas. Kitos dozės davimas gyvūnams atidedamas tol, kol bus įsitikinta, kad išgyveno anksčiau dozę gavę gyvūnai.

Išimtiniais atvejais ir tik jei tai pagrįsta tam tikrais reguliavimo sumetimais, galima spręsti, ar skirti papildomą viršutinės ribos fiksuotą 5 000 mg/kg dydžio dozę (žr. 2 priedėlį). Dėl gyvūnų gerovės priešasčių neskatinama atlikti bandymo taikant GHS 5 kategorijos intervalą (2 000–5 000 mg/kg) ir apie tokio bandymo reikalingumą turėtų būti sprendžiama, kai yra didelė tikimybė, kad jo rezultatai yra tiesiogiai sietini su žmonių arba gyvūnų sveikatos arba aplinkos apsauga.

##### 1.5.3. Ribinis bandymas

Ribinis bandymas visų pirma atliekamas tais atvejais, kai bandytojas turi informacijos, rodančios, kad bandomoji medžiaga greičiausiai yra netoksiška, t. y. toksiškumas pasireiškia esant didesnėms nei reglamentuojamos ribinėms dozėms. Apie bandomosios medžiagos toksiškumą galima sužinoti remiantis informacija apie panašius bandytus junginius arba panašius bandytus mišinius ar produktus, atsižvelgiant į toksikologiškai reikšmingų komponentų tapatumą ir procentinę dalį. Tais atvejais, kai informacijos apie medžiagos toksiškumą yra mažai arba jos išvis nėra, arba kai ta informacija leidžia manyti, kad bandomoji medžiaga yra toksiška, turi būti atliekamas pagrindinis bandymas.



Kai skiriama viena 2 000 mg/kg kūno masės dozė, ribiniam bandymui galima imti šešis gyvūnus (po tris vienai pakopai). Išimtiniais atvejais, kai skiriama viena 5 000 mg/kg dozė, ribiniam bandymui galima naudoti tris gyvūnus (žr. 2 priedėlį). Jei pastebimas su medžiaga siejamas gaišimas, gali tekti daryti bandymą esant gretimai mažesnei dozei.

## 1.6. STEBĖJIMAI

Kiekvienas dozę gavęs gyvūnas stebimas bent vieną kartą per pirmąsias 30 min. ir periodiškai per pirmąsias 24 h, skiriant ypatingą dėmesį pirmosioms keturioms valandoms, o vėliau kartą per dieną visas 14 parų, išskyrus atvejus, kai gyvūnams reikia nutraukti bandymą ir humaniškai numarinti dėl gyvūnų gerovės priežasčių arba kai jie nugaišta. Tačiau stebėjimo trukmė neturi būti griežtai fiksuojama. Ji nustatoma pagal toksines reakcijas, sveikimo laikotarpio pradžią ir trukmę, taigi prireikus ji gali būti pratęsta. Svarbus yra toksiškumo požymių atsiradimo ir išnykimo momentas, ypač jei yra uždelsto toksiškumo tendencija (12). Visi stebėjimai sistemingai užrašomi, apie kiekvieną gyvūną atskirai.

Jei gyvūnams ir toliau pasireiškia toksiškumo požymiai, reikia stebėti papildomai. Reikia stebėti odos ir kailio, akių ir gleivinės pasikeitimus, be to kvėpavimo, kraujo, autonominės ir centrinės nervų sistemų, somatomotorinio aktyvumo ir elgesio pasikeitimus. Ypač reikia stebėti, ar nepasireiškia drebulys, traukuliai, viduriavimas, mieguistumas, miego ir komos būsenos, ar neteka seilės. Reikėtų atsižvelgti į principus ir kriterijus, apibendrintus Rekomendaciniame dokumente dėl poveikio žmonėms (9). Gaištantys gyvūnai ir gyvūnai, kurie patiria didelius skausmus arba kuriems pasireiškia ilgalaikiai sunkių kančių požymiai, turėtų būti humaniškai numarinami. Kai gyvūnai numarinami dėl gyvūnų gerovės priežasčių arba randami negyvi, žūties laikas užrašomas kuo tiksliau.

### 1.6.1. Kūno masė

Kiekvieno gyvūno masė turi būti nustatoma prieš pat bandomosios medžiagos davimą ir vėliau mažiausiai kas savaitę. Turi būti apskaičiuotas ir užrašytas masės pokytis. Pasibaigus bandymui, išlikę gyvūnai pasveriami ir humaniškai numarinami.

### 1.6.2. Patologija

Visiems bandomiesiems gyvūnams (įskaitant nugaišusius per bandymą arba pašalintus iš bandymo dėl gyvūnų gerovės priežasčių) daroma bendroji nekroskopija. Turėtų būti aprašomi visi dideli kiekvieno gyvūno patologiniai pokyčiai. Gyvūnams, kurie išgyveno 24 h arba ilgiau, galima būtų atlikti mikroskopinį organų, turinčių aki-vaizdžių patologinių pokyčių, tyrimą, kadangi jis gali suteikti naudingos informacijos.

## 2. DUOMENYS

Turėtų būti pateikiami atskiri duomenys apie kiekvieną gyvūną. Be to, visi duomenys apibendrinami lentelėse, kuriose nurodomas kiekvienos bandymo grupės gyvūnų skaičius, toksiškumo požymių turinčių gyvūnų skaičius, darant bandymą žuvusių arba dėl gyvūnų gerovės priežasčių numarintų gyvūnų skaičius, atskirų gyvūnų žūties laikas, toksinio poveikio aprašymas ir eiga, grįžtamumas, nekroskopijos duomenys.

## 3. ATASKAITOS RENGIMAS

### 3.1. BANDYMO ATASKAITA

Bandymo ataskaitoje turi būti pateikta ši informacija, jei taikoma:

Bandomoji medžiaga:

- fizikinė būsena, grynumas ir, jei svarbu, fizikinės ir cheminės savybės (įskaitant izomerizavimą),
- tapatumas, įskaitant CAS numerį.

Nešiklis (jei taikoma):

- nešiklio pasirinkimo pagrindimas, jei tai ne vanduo.



Bandomieji gyvūnai:

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

Bandymo sąlygos:

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

Rezultatai:

- kiekvieno gyvūno reakcijos duomenų ir dozės dydžio lentelės (t. y. gyvūnų, kuriems pasireiškia toksiškumo požymiai, įskaitant nugašimą, poveikio tipą, sunkumą ir trukmę),
- kūno masės ir jos kitimo lentelės,
- kiekvieno gyvūno masė dozės davimo dieną, vėliau kas savaitę ir žūties arba numarinimo dieną,
- žūties data ir laikas, jei tai įvyksta prieš planinį numarinimą,
- toksiškumo požymių kiekvienam gyvūnui atsiradimas ir jų eiga, taip pat grįžtamumas kiekvieno gyvūno atveju,
- kiekvieno gyvūno nekroskopijos ir histopatologiniai duomenys, jei yra.

Rezultatų aptarimas ir aiškinimas.

Išvados.

#### 4. NUORODOS

- 1) Roll R., Hofer-Bosse Th. And Kayser D. (1986). New Perspectives in Acute Toxicity Testing of Chemicals. Toxicol. Lett., Suppl. 31, p. 86
- 2) Roll R., Riebschlager M., Mischke U. and Kayser D. (1989). Neue Wege zur Bestimmung der akuten Toxizität von Chemikalien. Bundesgesundheitsblatt 32, p. 336–341.
- 3) Diener W., Sichha L., Mischke U., Kayser D. and Schleder 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 Schleder E. (1995). The Biometric Evaluation of the OECD Modified Version of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). Arch. Toxicol. 69, p. 729–734.

- 5) Diener W., and Schlede E. (1999) Acute Toxicity Class Methods: Alterations to LD/LC<sub>50</sub> Tests. ALTEX 16, p. 129–134
- 6) Schlede E., Mischke U., Roll R. and Kayser D. (1992). A National Validation Study of the Acute-Toxic- Class Method – An Alternative to the LD<sub>50</sub> Test. Arch. Toxicol. 66, p. 455–470.
- 7) Schlede E., Mischke U., Diener W. and Kayser D. (1994). The International Validation Study of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). Arch. Toxicol. 69, p. 659–670.
- 8) OECD (2001) Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing. Environmental Health and SAFETY Monograph Series on Testing and Assessment N. 24. Paris.
- 9) OECD (2000) Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in SAFETY Evaluation. Environmental Health and SAFETY Monograph Series on Testing and Assessment N 19.
- 10) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System For Human Health And Environmental Effects Of Chemical Substances as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals in November 1998, Part 2, p. 11 [<http://webnetl.oecd.org/oecd/pages/home/displaygeneral/0,3380,EN-documents-521-14-no-24-no-0,FF.html>].
- 11) Lipnick R L, Cotruvo, J A, Hill R N, Bruce R D, Stitzel K A, Walker A P, Chu I; Goddard M, Segal L, Springer J A and Myers R C (1995) Comparison of the Up-and Down, Conventional LD<sub>50</sub>, 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.

## 1 PRIEDĖLIS

**PROCEDŪRA, TAIKOMA NAUDOJANT KIEKVIENĄ PRADINĘ DOZĘ***BENDROSIOS PASTABOS*

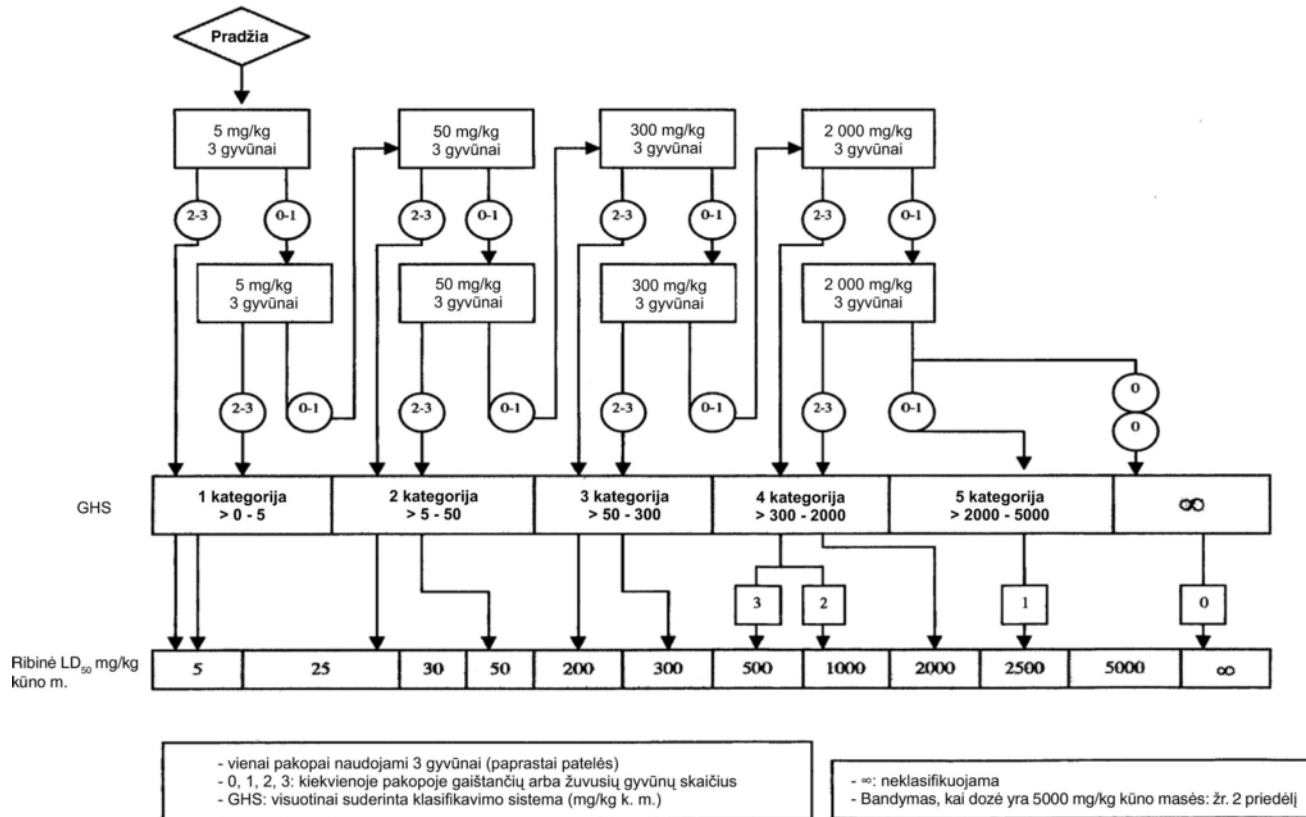
Į šį priedą įtrauktose atitinkamose bandymo schemose aprašoma kiekvienos pradinės dozės procedūra, kurios reikia laikytis.

- 1 A priedelis: pradinė dozė 5 mg/kg kūno masės
- 1 B priedelis: pradinė dozė 50 mg/kg kūno masės
- 1 C priedelis: pradinė dozė 300 mg/kg kūno masės
- 1 D priedelis: pradinė dozė 2 000 mg/kg kūno masės

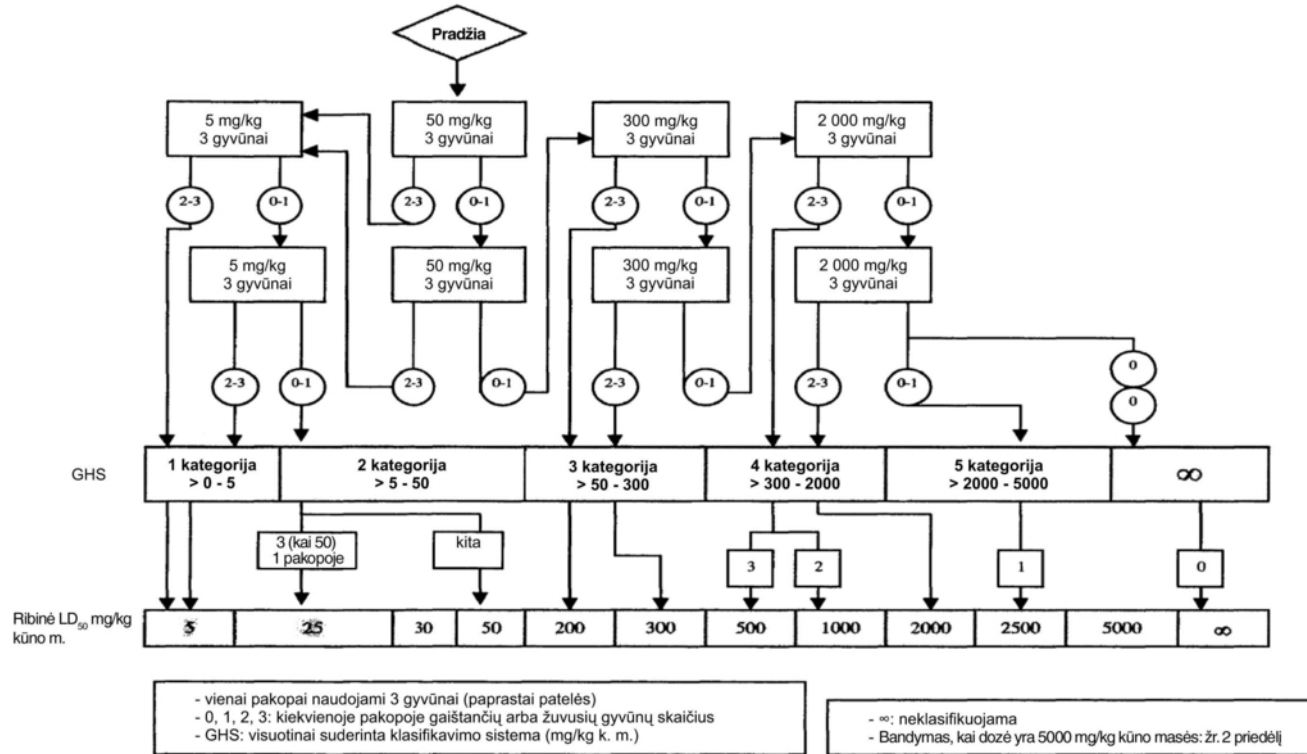
Atsižvelgiant į humaniškai numarintų arba nugaišusių gyvūnų skaičių, bandymo eiga žymima rodyklėmis.

1 A PRIEDĖLIS

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

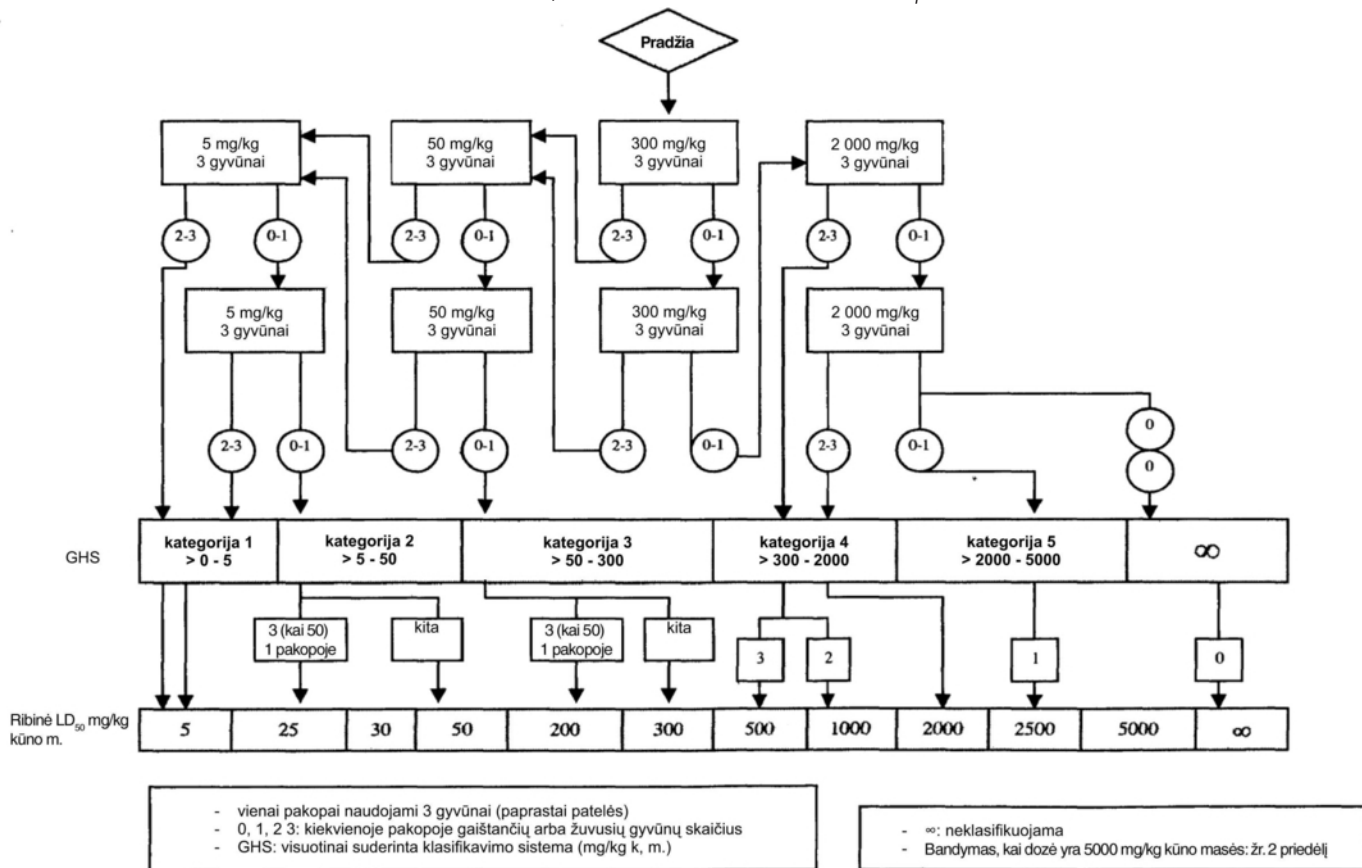


BANDYMO PROCEDŪRA, KAI PRADINĖ DOZĖ YRA 50 MG/KG KŪNO MASĖS

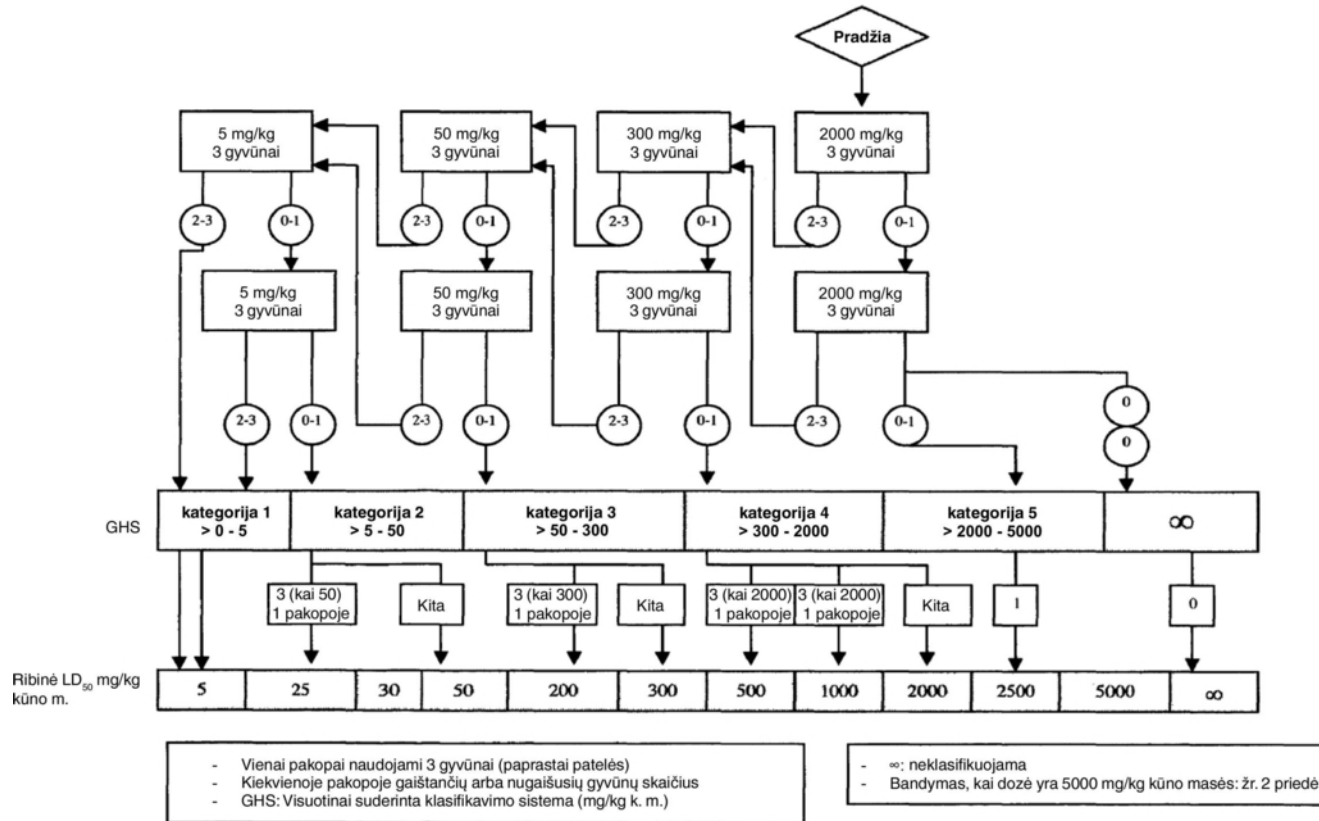


1 C PRIEDĒLIS

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



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



## 2 PRIEDĖLIS

**BANDOMŪJŲ MEDŽIAGŲ, KURIŲ TIKĖTINOS LD<sub>50</sub> VERTĖS YRA DIDESNĖS NEGU 2 000 MG/KG, KLASIFIKAVIMO KRITERIJAI NEDARANT BANDYMO**

5 pavojaus kategorijos kriterijai yra apibrėžti, kad būtų galima nustatyti bandomąsias medžiagas, kurių ūmaus toksiškumo pavojus yra palyginti mažas, tačiau kurios esant tam tikroms aplinkybėms gali būti pavojingos pažeidžiamoms populiacijoms. Tikėtina, kad šių medžiagų LD<sub>50</sub> per virškinamąjį traktą arba odą yra 2 000–5 000 mg/kg arba ekvivalentinė dozė, kai medžiagos patenka kitais būdais. Bandomosios medžiagos galėtų būti priskirtos pavojaus kategorijai, apibrėžtai 2 000 mg/kg < LD<sub>50</sub> < 5 000 mg/kg (5 kategorija pagal GHS), šiais atvejais:

- a) jei būtų priskirtos šiai kategorijai pagal kurią nors iš 1a-1d schemų, remiantis gaištamumo dažnumu;
- b) jei jau yra patikimų duomenų, rodančių, kad LD<sub>50</sub> yra 5 kategorijos verčių intervale, arba kiti bandymai su gyvūnais arba toksinis poveikis žmonėms rodo ūmaus tipo poveikį žmonių sveikatai;
- c) gaunant duomenis ekstrapoliavimo, įvertinimo arba matavimo būdu, jei priskyrimas didesnio pavojaus klasei nepagrįstas ir
  - yra patikimos informacijos, rodančios didelį toksinį poveikį žmonėms, arba
  - pastebimas tam tikras gaištamumas, kai bandymas atliekamas per virškinamąjį traktą duodant dozes, siekiančias 4 kategorijos vertes, arba
  - jei tęsiant bandymus iki 4 kategorijos verčių ekspertų sprendimu patvirtinami reikšmingi klinikiniai toksiškumo požymiai, išskyrus viduriavimą, pasišiaušusius plaukus arba nesveiko gyvūno išvaizdą, arba
  - jei ekspertų sprendimu patvirtinama patikima darant kitus bandymus su gyvūnais gauta informacija, rodanti galimą reikšmingą ūmų poveikį.

**BANDYMAS ESANT DIDESNĖMS KAIP 2 000 MG/KG DOZĖMS**

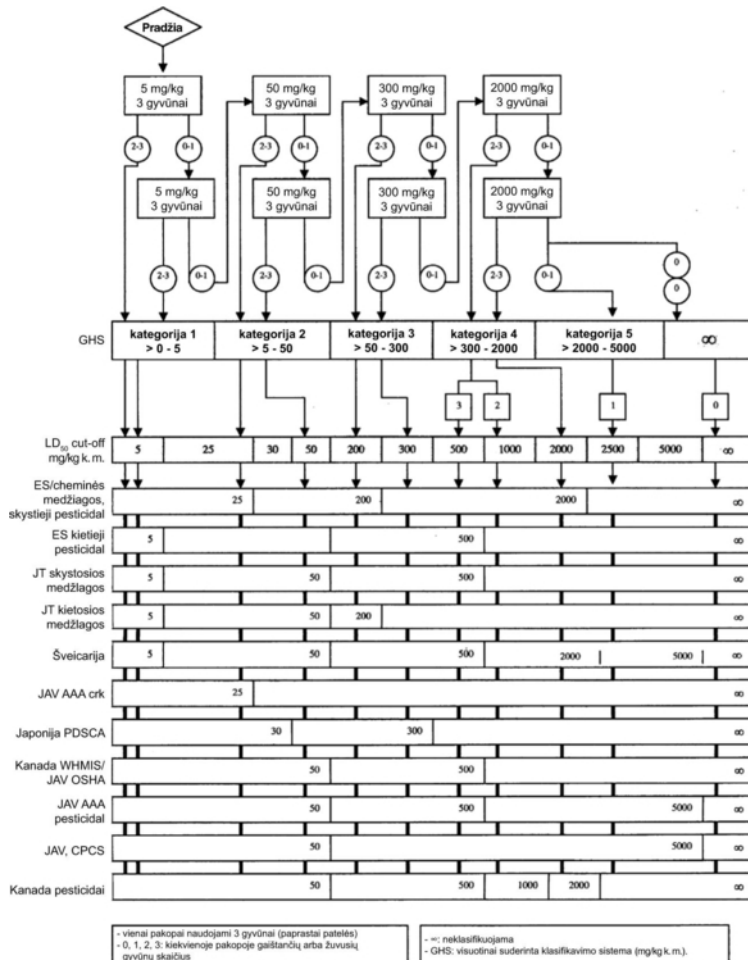
Pripažįstant būtinumą apsaugoti gyvūnų gerovę, bandymas su gyvūnais skiriant 5 kategorijos intervalo dozes (5 000 mg/kg) neskatinamas ir apie tokio bandymo būtinybę turėtų būti sprendžiama, kai yra didelė tikimybė, kad jo rezultatai yra tiesiogiai sietini su žmonių arba gyvūnų sveikatos apsauga (10).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

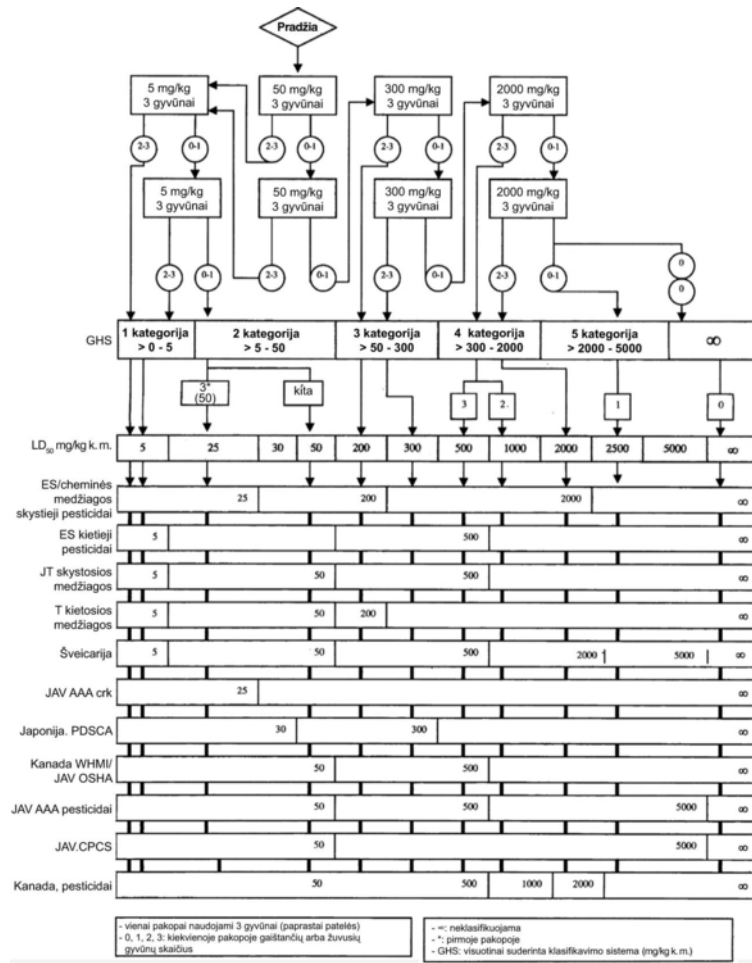
Kai reikia bandyti naudojant 5 000 mg/kg dozę, reikalinga tik viena pakopa (t. y. trys gyvūnai). Jei žūsta pirmas dozę gavęs gyvūnas, dozavimas tęsiamas skiriant 2 000 mg/kg dozę pagal 1 priedėlyje pateiktas schemas. Jei pirmas gyvūnas lieka gyvas, dozę gauna kiti du gyvūnai. Jei žūsta tik vienas iš trijų gyvūnų, daroma prielaida, kad LD<sub>50</sub> vertė yra didesnė negu 5 000 mg/kg. Jei žūsta abu gyvūnai, dozavimas tęsiamas skiriant 2 000 mg/kg dozę.

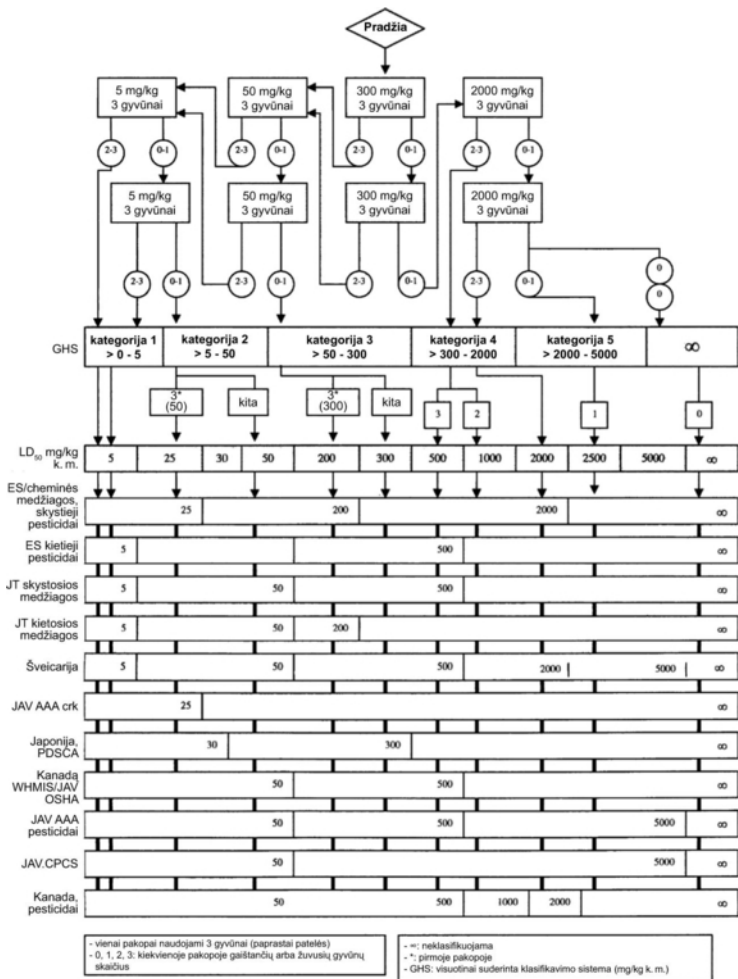


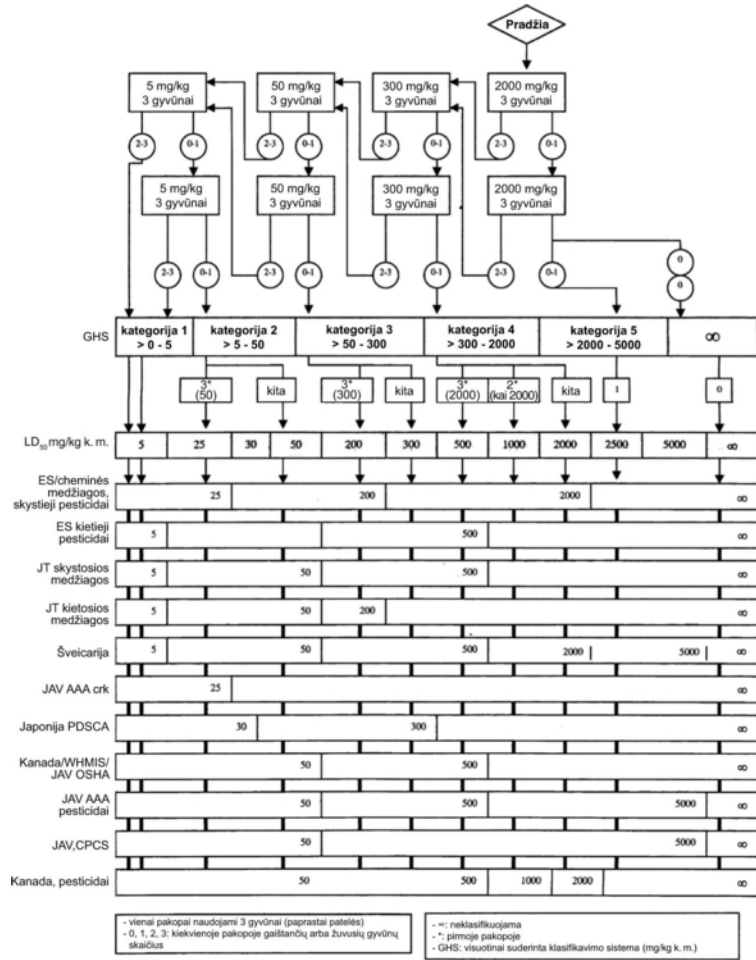
3 PRIEDĖLIS

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









## B.2. ŪMUS TOKSIŠKUMAS (PER KVĖPAVIMO TAKUS)

## 1. METODAS

## 1.1. ĮVADAS

Naudinga turėti išankstinės informacijos apie medžiagos dalelių dydžio pasiskirstymą, garų slėgį, lydymosi temperatūrą, virimo temperatūrą, pliūpsnio temperatūrą ir sprogumą (jeigu tinka).

Taip pat žr. Bendrojo įvado B dalies A skirsnį.

## 1.2. APIBRĖŽTYS

Žr. Bendrojo įvado B dalies B skirsnį.

## 1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Nėra.

## 1.4. BANDYMO METODO PRINCIPAS

Kelios eksperimentinių gyvūnų grupės apibrėžtą laikotarpį veikiamos tam tikros skirtingos koncentracijos bandomąja medžiaga; vieno dydžio koncentracija naudojama vienai grupei. Po to atliekami poveikio ir žūties atveju stebėjimai. Gyvūnams, kurie nugaišta bandymo metu, atliekama nekroskopija, o užbaigus bandymą nekroskopija atliekama ji išgyvenusiems gyvūnams.

Gyvūnus, kurie turi aiškių ir ilgalaikių kančios ir skausmo požymių, gali tekti humaniškai numarinti. Bandomosios medžiagos nereikėtų duoti tokiomis dozėmis, kurios neabejotinai sukeltų skausmo ir kančių dėl ardančių (ėsdinančių) arba dirginančių savybių.

## 1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

Nėra.

## 1.6. BANDYMO METODO APIBŪDINIMAS

## 1.6.1. Pasiruošimas

Gyvūnai laikomi eksperimentinėmis laikymo ir šėrimo sąlygomis ne trumpiau kaip penkias dienas iki eksperimento. Prieš bandymą sveiki jauni gyvūnai yra atrenkami atsitiktinai ir suskirstomi į reikalingą grupių skaičių. Jie neturi patirti dirbtinai sukurto poveikio, išskyrus atvejus, jei tai daryti rekomenduojama dėl tam tikro veikimo aparato tipo.

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

Prireikus į bandomąją medžiagą gali būti dedama atitinkamo tirpiklio, kad būtų gaunama atitinkama bandomosios medžiagos koncentracija atmosferoje; tokiu atveju naudojama kontrolinė tirpiklio grupė. Jeigu tirpiklis ar kiti priedai yra naudojami dozavimui palengvinti, turėtų būti žinoma, kad jie nesukels toksinio poveikio. Gali būti naudojamos ankstesniais duomenimis, jei jų yra.

## 1.6.2. Bandymo sąlygos

## 1.6.2.1. Eksperimentiniai gyvūnai

Jeigu nėra kontraindikacijų, pirmenybė teikiama žiurkėms. Turėtų būti panaudojamos plačiai naudojamos laboratorinės veislės. Bandymo pradžioje abiejų lyčių gyvūnų svoris turėtų būti  $\pm 20\%$  atitinkamo vidutinio svorio.

#### 1.6.2.2. Skaičius ir lytis

Kiekviena koncentracija bandoma su ne mažiau kaip dešimčia graužikų (penki patinėliai ir penkios patelės). Patelės turėtų būti neturėjusios palikuonių ir neapvaisintos.

*Pastaba:* Atliekant ūmaus toksiškumo bandymus su aukštesniaisiais gyvūnais nei graužikai, turi būti apsvartoma galimybė naudoti mažesnę gyvūnų skaičių. Dozės turėtų būti atidžiai parenkamos ir turėtų būti dedamos visos pastangos neviršyti vidutinio toksiškumo dozių. Tokiuose bandymuose turėtų būti vengiama mirtinų bandomosios medžiagos dozių.

#### 1.6.2.3. Poveikio koncentracijos

Koncentracijų skaičius turėtų būti pakankamas, ne mažiau trys. Jos turėtų pakankamai skirtis, kad bandomiesiems gyvūnams pasireikštų įvairus toksinis poveikis ir skirtingo dydžio gaištamumo procentas. Duomenų turi būti tiek, kad pakaktų sudaryti mirtinų koncentracijų kreivę ir, jei įmanoma, tinkamai nustatyti LC<sub>50</sub>.

#### 1.6.2.4. Ribinis bandymas

Jeigu penkis bandomus patinėlius ir penkias bandomas pateles paveikus 20 mg bandomosios medžiagos litre dujų arba 5 mg bandomosios medžiagos litre aerozolio arba dalelių (arba, jeigu tai neįmanoma dėl bandomosios medžiagos fizikinių arba cheminių, taip pat ir sprogdumo savybių, tuomet didžiausia įmanoma koncentracija) keturias valandas, per 14 dienų nebūna su tuo cheminiu junginiu susijusių nugaišimo atvejų, laikoma, kad tolesnis bandymas yra nebūtinas. (18-ta ATP, dir. 93/21/EEB, L1 10/93).

#### 1.6.2.5. Poveikio trukmė

Poveikio trukmė turėtų būti keturios valandos.

#### 1.6.2.6. Įranga

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 veikiamoji atmosfera. Jeigu naudojama kamera, ji turėtų būti tokios konstrukcijos, kad gyvūnai kuo mažiau susigrūstų ir kad jie įkvėptų kuo daugiau bandomosios 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 bandomosios medžiagos patekimą kitais keliais.

#### 1.6.2.7. 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, ji gali būti pailginama. Labai svarbu, kada toksiškumo požymiai atsiranda ir išnyksta, bei nugaišimo laikas, ypač jeigu yra tendencija, kad žūtis pasireiškia vėliau.

#### 1.6.3. Bandymo eiga

Prieš pat poveikį gyvūnai pasveriami ir po to paveikiami bandomąja koncentracija tam skirtame aparate keturias valandas po to, kai kameroje nusistovi koncentracijos pusiausvyra. Pusiausvyros nusistovėjimo trukmė turi būti trumpa. Temperatūra, kurioje vykdomas bandymas, turėtų būti išlaikoma  $22 \pm 3$  °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 ( $\geq 5$  mm vandens) užkertamas kelias bandomajai medžiagai patekti į aplinką. Veikimo laikotarpiu neturėtų būti duodama pašaro ir vandens. Turėtų būti naudojamos atitinkamos bandymo atmosferos generavimo ir stebėsenos sistemos, kuriomis būtų galima kuo greičiau užtikrinti vienodą poveikį. Kamera turėtų būti tokios konstrukcijos ir taip veikti, kad jos viduje bandomo atmosfera pasiskirstytų vienodai.

Turėtų būti atliekami šie matavimai arba stebėsenos:

- a) oro srauto greičio (visą laiką);

- b) tikrosios bandomosios medžiagos koncentracijos, matuojamos kvėpavimo zonoje ne mažiau kaip tris kartus veikimo laikotarpiu (esant tam tikrai atmosferai, pvz., naudojant didelės koncentracijos aerozolius, gali tekti vykdyti dažnesnę stebėseną). Veikimo laikotarpiu koncentracija neturėtų keistis daugiau negu  $\pm 15\%$  vidutinės vertės. Tačiau naudojant tam tikrus aerozolius, šio kontrolės lygio gali būti neišmanoma 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, jei įmanoma, visą laiką.

Veikimo laikotarpiu 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 nekroskopija arba užšaldymas ir nusilpusių arba gaištančių gyvūnų izoliavimas arba numarinimas.

Stebimi odos ir kailio, akių, gleivinės pasikeitimai, taip pat respiratorinės, kraujo, autonominės ir centrinės nervų sistemų ir somatomotorinio aktyvumo ir elgsenos pasikeitimai. Ypatingas dėmesys turėtų būti skiriamas kvėpavimo, drebulių, konvulsijų, seilėjimosi, viduriavimo, 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 pabaigus bandymą, atliekama nekroskopija, ypač atkreipiant dėmesį į visus viršutinių ir apatinių kvėpavimo takų pokyčius. Turėtų būti užregistruojami visi dideli pataloginiai 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 kitokių toksiškumo požymių, skaičių, pateikiant toksinio poveikio ir nekroskopijos duomenų aprašymą. Turėtų būti apskaičiuojami ir registruojami svorio pasikeitimai, jeigu išgyvenama ilgiau negu vieną dieną. Gyvūnai, kurie humaniškai numarinami dėl cheminio junginio sukeltamų kančių ir skausmo, užregistruojami kaip nugaišimo atvejai, kurių priežastis – cheminis junginys. LD<sub>50</sub> turėtų būti nustatoma pripažintu metodu. Duomenų vertinime reikėtų nurodyti sąryšį, jeigu toks yra, tarp gyvūnų poveikio bandomąja medžiaga ir visų anomalijų atsiradimo ir stiprumo, įskaitant elgsenos ir kliniškes anomalijas, didesnių audinių pakitimų, kūno svorio pasikeitimų, gaištamumo ir kito toksinio poveikio.

## 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: veikimo 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, aerozolio koncentracijos ir dalelių dydžio pasiskirstymo matavimo įranga.

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 bandomos medžiagos kiekis, įdėtas į inhaliacijos įrenginį, padalytas iš oro tūrio);

- d) nešiklio, jeigu naudotas, rūšis;
- e) faktinės koncentracijos kvėpavimo bandymo zonoje;
- f) masės vidutinis aerodinaminis skersmuo (MMAD) ir geometrinis standartinis nuokrypis (GSD);
- g) pusiausvyros nustatymo laikotarpis;
- h) veikimo laikotarpis;
  - duomenų apie reakciją pagal lytį ir poveikį surašymas į lenteles (pvz., gyvūnų, kurie nugaišo arba buvo numarinti bandymo metu, skaičius; toksiškumo požymių turinčių gyvūnų skaičius; paveiktų gyvūnų skaičius),
  - nugaišimo laikas veikimo metu arba po jo, priežastys ir kriterijai, kuriais naudotasi humaniškai numarinant gyvūnus,
  - visi pastebėjimai,
  - kiekvienos lyties  $LC_{50}$  vertė, nustatyta stebėjimo laikotarpio pabaigoje (nurodant apskaičiavimo metodą),
  - $LC_{50}$  95 % pasikliautinis intervalas (tais atvejais, kai gali būti pateikta),
  - dozės ir gaištamumo kreivė ir statusas (jeigu įmanoma pagal nustatymo metodą),
  - nekroskopijos duomenys,
  - visi histopatologiniai duomenys,
  - rezultatų aptarimas (ypatingas dėmesys turėtų būti skiriamas tam, kokį poveikį humaniškas gyvūnų numarinimas bandymo metu galėtų turėti apskaičiuojamai  $LC_{50}$  vertei),
  - rezultatų aiškinimas.

### 3.2. REZULTATŲ APSKAIČIAVIMAS IR AIŠKINIMAS

Žr. Bendrojo įvado B dalies D skirsnį.

### 4. NUORODOS

Žr. Bendrojo įvado B dalies E skirsnį.



## B.3. ŪMUS TOKSIŠKUMAS (PER ODA)

## 1. METODAS

## 1.1. ĮVADAS

Žr. Bendrojo įvado B dalies A skirsnį.

## 1.2. APIBRĖŽTYS

Žr. Bendrojo įvado B dalies B skirsnį.

## 1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Nėra.

## 1.4. BANDYMO METODO PRINCIPAS

Bandomoji medžiaga dedama ant odos skirtingomis dozėmis kelioms eksperimentinių gyvūnų grupėms, viena dozė – vienai grupei. Po to atliekami poveikio ir nugaišimo atvejų stebėjimai. Gyvūnams, kurie nugaišta bandymo metu, atliekama nekroskopija, ir, užbaigus bandymą, atliekama bandymą išgyvenusių gyvūnų nekroskopija.

Gyvūnus, kurie turi aiškių ir ilgalaikių kančios ir skausmo požymių, reikia humaniškai numarinti. Jeigu žinoma, kad dėl medžiagų, naudojamų dozavimo bandymuose, gali kilti skausmas ir kančia dėl jų ardančių (ėsdinančių) arba dirginančių savybių, tokie bandymai neturėtų būti atliekami.

## 1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

Nėra.

## 1.6. BANDYMO METODO APIBŪDINIMAS

## 1.6.1. Pasirengimas

Gyvūnai laikomi eksperimentiniuose narveliuose eksperimentinėmis laikymo ir šėrimo sąlygomis ne trumpiau kaip penkias dienas iki eksperimento pradžios. Prieš bandymą sveiki jauni suaugę gyvūnai atsitiktinai atrenkami ir paskiriami į bandomąsias grupes. Apytikriai 24 valandas iki bandymo nuo gyvūno kūno sprando srityje pašalinamas kailis, jį nukerpant arba nuskutant. Jeigu kailis kerpamas arba skutamas, reikia stengtis nenutrinti odos, tai gali pakeisti pralaidumą. Bandomajai medžiagai uždėti turėtų būti nukirpta ar nuskusta ne mažiau kaip 10 % kūno paviršiaus. Jeigu bandomos kietosios medžiagos, kurios atitinkamais atvejais gali būti pulverizuojamos, bandomoji medžiaga turėtų būti pakankamai sudrėkinama vandeniu arba, jeigu reikia, atitinkamu nešikliu, kad būtų užtikrinamas geras sąlytis su oda. Jeigu naudojamas nešiklis, turėtų būti atsižvelgiama į jo poveikį bandomosios medžiagos įsiskverbimui į odą. Skystos bandomosios medžiagos paprastai naudojamos neskiestos.

## 1.6.2. Bandymo sąlygos

## 1.6.2.1. Eksperimentiniai gyvūnai

Gali būti naudojamos suaugusios žiurkės arba triušiai. Gali būti naudojamos ir kitos rūšys, bet jų naudojimas turėtų būti pagrįdžiamas. Turėtų būti panaudojamos įprastos laboratorinės veislės. Bandymo pradžioje abiejų lyčių gyvūnų svoris turėtų būti  $\pm 20\%$  atitinkamo vidutinio svorio.

## 1.6.2.2. Skaičius ir lytis

Kiekvienai dozei naudojama ne mažiau kaip 5 gyvūnai. Jie visi turėtų būti vienos lyties. Jeigu naudojamos patelės, jos turėtų būti neturėjusios palikuonių ir neapvaisintos. Jeigu galima gauti informacijos, įrodančios, kad kuri nors lytis yra daug jautresnė, dozė taikoma tai lyčiai.

*Pastaba.* Atliekant ūmaus toksiškumo bandymus su aukštesniaisiais gyvūnais nei graužikai, turi būti apsvaistoma galimybė naudoti mažesnę gyvūnų skaičių. Dozės turėtų būti atidžiai parenkamos ir turėtų būti dedamos visos pastangos neviršyti vidutinio toksiškumo dozių. Tokiuose bandymuose turėtų būti vengiama mirtinų bandomosios medžiagos dozių.

#### 1.6.2.3. *Dozės*

Dozių skaičius turėtų būti pakankamas, ne mažiau kaip trys. Jos turėtų pakankamai skirtis, kad bandomiesiems gyvūnams pasireikštų įvairūs toksinis poveikis ir skirtingo dydžio gaištamumo procentas. Parenkant dozės dydį reikia atsižvelgti į jautrinimo ar esdinimo poveikį. Duomenų turėtų būti tiek, kad būtų galima sudaryti dozės ir reakcijos kreivę ir, jeigu įmanoma, būtų galima nustatyti LD<sub>50</sub>.

#### 1.6.2.4. *Ribinis bandymas*

Galima atlikti ribinį bandymą su penkiais patinėliais ir penkiomis patelėmis, jiems skiriant vienetinę 2 000 mg/kg kūno masės dozę pagal pirmiau aprašytą darbo eigą. Jeigu cheminis junginys tampa nugaišimo priežastimi, reikėtų apsvaistyti, ar nereikėtų atlikti išsamų tyrimą.

#### 1.6.2.5. *Stebėjimo laikotarpis*

Stebėjimo laikotarpis turėtų būti ne trumpesnis kaip 14 dienų. Tačiau stebėjimo trukmė neturėtų būti griežtai nustatoma. Ji turėtų būti nustatoma pagal toksines reakcijas, jų pasireiškimo dažnumą ir sveikimo laikotarpio trukmę; todėl, jeigu laikoma reikalinga, ji gali būti pailginama. Labai svarbu, kada toksiškumo požymiai atsiranda ir išnyksta, bei nugaišimo laikas, ypač jeigu yra tendencija, kad žūtis pasireiškia vėliau.

#### 1.6.3. **Bandymo eiga**

Gyvūnai turėtų būti laikomi atskiruose narveliuose. Bandomoji medžiaga turėtų būti tolygiai uždedama ant plotelio, kurio dydis sudaro apie 10 % viso kūno paviršiaus. Jeigu medžiagos labai toksiškos, paveikiamas paviršius gali būti mažesnis, bet kaip galima didesnis plotas turėtų būti padengiamas kuo plonesniu ir lygesniu sluoksniu.

Bandomoji medžiaga turėtų liestis su oda akytu marlės tvarščiu ir nedirginančia lipnia juostele per visą 24 valandų veikimo laiką. Bandomoji vieta turėtų būti papildomai tinkamai uždengta, kad marlės tvarstis ir bandomoji medžiaga laikytųsi bei būtų užtikrinama, kad gyvūnai neperaris bandomosios medžiagos. Gali būti naudojami ribotuvai, kad bandomoji medžiaga nebūtų praryjama, bet visiško imobilizavimo metodas nerekomenduojamas.

Veikimo laikotarpio pabaigoje bandomosios medžiagos likutis turėtų būti nuimamas, paprastai naudojant vandenį ar koki kitą atitinkamą odos valymo būdą.

Veikimo metu atliekami stebėjimai, kurie sistemingai užrašomi. Apie kiekvieną gyvūną turėtų būti daromi atskiri įrašai. Pirmą dieną stebėjimai turėtų būti atliekami dažnai. Kruopštus klinikinis ištyrimas turėtų būti atliekamas ne rečiau kaip vieną kartą kiekvieną darbo dieną, kiti stebėjimai turėtų būti vykdomi kiekvieną dieną, imantis atitinkamų veiksmų kuo labiau sumažinti bandymo metu prarandamų gyvūnų skaičių, pvz., rastų negyvų gyvūnų nekroskopija arba užšaldymas ir nusilpusių arba gaištančių gyvūnų izoliavimas arba numarinimas.

Turėtų būti stebimi odos ir kailio, akių ir gleivinės pasikeitimai, taip pat respiratorinės, kraujo, autonominės ir centrinės nervų sistemų ir somatomotorinio aktyvumo ir elgsenos pasikeitimai. Ypatingas dėmesys turėtų būti skiriamas drebulių, konvulsijų, seilėjimosi, viduriavimo, letargo, miego ir komos stebėjimams. Nugaišimo laikas turėtų būti užrašomas kuo tiksliau. Gyvūnams, kurie nugaišta bandymo metu, ir tiems, kurie išlieka gyvi pabaigus bandymą, atliekama nekroskopija. Visi dideli patologiniai pokyčiai turėtų būti registruojami. Jeigu nurodyta, turėtų būti paimami audiniai histopatologiniam tyrimui.

#### *Toksiškumo priešingai lyčiai įvertinimas*

Užbaigus bandymą su viena lytimi, dozė skiriama ne mažiau kaip vienai grupei, susidedančiai iš 5 priešingos lyties gyvūnų, kad būtų nustatyta, ar šios lyties gyvūnai nėra jautresni bandomajai medžiagai. Atskirais atvejais pateisinamas mažesnio gyvūnų skaičiaus naudojimas. Jeigu galima gauti pakankamai informacijos, įrodančios, kad bandomos lyties gyvūnai yra daug jautresni, galima apsieiti be priešingos lyties gyvūnų bandymo.

## 2. DUOMENYS

Duomenys turėtų būti apibendrinami lentelėse, nurodant kiekvienos grupės gyvūnų skaičių bandymo pradžioje, kiekvieno gyvūno nugaišimo laiką, gyvūnų, turinčių kitokių toksiškumo požymių, skaičių, pateikiant toksinio poveikio ir nekroskopijos duomenų aprašymą. Kiekvieno gyvūno svoris turėtų būti nustatomas ir užrašomas prieš pat uždedant bandomosios medžiagos, po to kartą per savaitę ir nugaišimo metu; svorio pasikeitimai turėtų būti apskaičiuojami ir užrašomi, jeigu išgyvenama ilgiau negu vieną dieną. Gyvūnai, kurie humaniškai numarinami dėl cheminio junginio sukiamų kančių ir skausmo, yra užregistruojami kaip žūties atvejai, kurių priežastis – cheminis junginys. LD<sub>50</sub> turėtų būti nustatoma pripažintu metodu.

Vertinant duomenis reikėtų įvertinti sąryšį, jeigu toks yra, tarp gyvūnų, paveiktų bandomąja medžiaga, ir visų anomalijų atsiradimo ir stiprumo, įskaitant elgsenos ir klinikinės anomalijas, didesnių audinių pakitimų, kūno svorio pasikeitimų, nugaišimo ir kito toksikologinio poveikio.

## 3. ATASKAITOS PATEIKIMAS

### 3.1. BANDYMO ATASKAITA

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

- rūšis, veislė, gyvūnų tiekėjas, aplinkos sąlygos, pašaras ir pan.,
- bandymo sąlygos (taip pat odos nuvalymo metodas ir tvarstymo būdas: pralaidus arba nepralaidus),
- dozės (nurodant nešiklį, jeigu naudojamas, ir koncentracijas),
- gyvūnų, kuriems įvestos dozės, lytis,
- duomenų lentelės pagal lytį ir dozes (t. y. gyvūnų, kurie nugaišo arba buvo numarinti bandymo metu, skaičius, toksiškumo požymių turinčių gyvūnų skaičius, paveiktų gyvūnų skaičius),
- nugaišimo laikas davus dozę, priežastys ir kriterijai, kuriais naudotasi humaniškai numarinant gyvūnus,
- visi pastebėjimai,
- išsamiam bandyme išbandytos lyties LD<sub>50</sub> vertė, nustatyta per 14 dienų (nurodant apibrėžtą nustatymo metodą),
- LD<sub>50</sub> 95 % pasikliautinis intervalas (tais atvejais, kai gali būti pateiktas),
- dozės ir gaištamumo kreivė ir statusas, jeigu įmanoma nustatyti pagal nustatymo metodą,
- nekroskopijos duomenys,
- visi histopatologiniai duomenys,
- bet kurio bandymo su priešinga lytimi rezultatai,
- rezultatų aptarimas (ypatingas dėmesys turėtų būti atkreipiamas į tai, kokį poveikį apskaičiuojamai LD<sub>50</sub> vertei gali turėti humaniškas gyvūnų numarinimas bandymo metu),
- duomenų aiškinimas.

3.2. DUOMENŲ ĮVERTINIMAS IR AIŠKINIMAS

Žr. Bendrojo įvado B dalies D skirsnį.

4. **NUORODOS**

Žr. Bendrojo įvado B dalies E skirsnį.

## B.4. ŪMUS TOKSIŠKUMAS. ODOS DIRGINIMAS AR ĖSDINIMAS

## 1. METODAS

Šis metodas atitinka OECD TG 404 (2002).

## 1.1. ĮVADAS

Rengiant šį atnaujintą metodą ypatingas dėmesys buvo kreipiamas į galimą gyvūnų gerovės pagerinimą ir į visos turimos informacijos apie bandomąją medžiagą įvertinimą, siekiant išvengti nebūtinų bandymų su laboratoriniais gyvūnais. Pagal šį metodą rekomenduojama, prieš darant aprašytą medžiagos ėsdinimo ar dirginimo *in vivo* bandymą, daryti turimų atitinkamų duomenų įrodomosios vertės analizę. Jei duomenų nepakanka, jų galima gauti darant nuoseklių bandymą (1). Į bandymo strategiją, pateikiamą kaip šio metodo priedėlis, įtraukti įteisinti ir priimti *in vitro* bandymai. Be to, jei tinka, darant pradinį *in vivo* bandymą vietoj vienalaikio rekomenduojamas nuoseklusis trijų bandomųjų tamponų uždėjimo gyvūnui bandymas.

Siekiant užtikrinti ir duomenų mokslinį patikimumą, ir gyvūnų gerovę, *in vivo* bandymai nedaromi tol, kol darant duomenų įrodomosios vertės analizę nebus įvertinti visi turimi duomenys, apibūdinantys galimą medžiagos ėsdinamąjį ar dirginamąjį poveikį odai. Tokius duomenis sudarys turimų bandymų su žmonėmis ir (arba) laboratoriniais gyvūnais rezultatai, ėsdinimo ar dirginimo duomenys, gauti apie vieną arba kelias medžiagas, turinčias giminą struktūrą, arba apie jų mišinius, duomenys, patvirtinantys medžiagos stiprias rūgštines arba šarmines savybes (2) (3), be to, įteisintų ir priimtų *in vitro* arba *ex vivo* bandymų rezultatai (4) (5) (5a). Ši analizė turėtų sumažinti poreikį *in vivo* bandyti tas medžiagas, apie kurių odos ėsdinamąjį ar dirginamąjį poveikį jau turima pakankamai kitų bandymų metu gautų duomenų.

Pirmenybė teikiama į šio metodo priedėlį įtrauktai nuosekliųjų bandymų strategijai, kurią sudaro įteisinti ir priimti *in vitro* arba *ex vivo* ėsdinimo ar dirginimo bandymai. Strategiją parengė ir vienbalsiai rekomendavo OECD seminario dalyviai (6), ji buvo priimta ir rekomenduota kaip visuotinai suderintos cheminių medžiagų klasifikavimo sistemos (GHS) bandymų strategija (7). Rekomenduojama laikytis šios bandymų strategijos prieš pradėdant *in vivo* bandymus. Tiriant naujas medžiagas, rekomenduojamas nuoseklusis bandymo būdas mokliškai pagrįstiems duomenims apie medžiagos ėsdinimo ar dirginimo savybes gauti. Tiriant esamas medžiagas, apie kurių odos ėsdinimo ar dirginimo savybes duomenų nepakanka, ši strategija turėtų būti taikoma tiek, kiek trūksta duomenų spragoms užpildyti. Kitokios bandymo strategijos arba metodikos taikymas arba sprendimas netaikyti nuosekliųjų bandymų metodo turi būti pagrįstas.

Jei darant duomenų įrodomosios vertės analizę ėsdinimo arba dirginimo savybių negalima nustatyti, pagal nuoseklaus bandymo strategiją reikėtų apsvarstyti *in vivo* bandymo atlikimą (žr. priedėlį).

## 1.2. APIBRĖŽTYS

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

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

## 1.3. BANDYMO METODO PRINCIPAS

Ant bandomo gyvūno odos dedama viena bandomosios medžiagos dozė; nepaveiktos gyvūno odos vietos naudojamos kontrolei. Nustatytais laiko tarpais nustatomas ir balais įvertinamas dirginimo ar ėsdinimo laipsnis, kuris papildomai aprašomas, siekiant išsamiai įvertinti poveikį. Bandymo trukmė turi būti tokia, kad pakaktų įvertinti, ar stebimas poveikis yra grįžtamas, ar negrįžtamas.

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

#### 1.4. BANDYMO METODO APRAŠYMAS

##### 1.4.1. Pasiruošimas *in vivo* bandymui

###### 1.4.1.1. Gyvūnų rūšies pasirinkimas

Tinkamiausias laboratorinis gyvūnas – baltasis triušis; naudojami sveiki, jauni ir suaugę triušiai. Kitų rūšių naudojimas turi būti pagrįstas.

###### 1.4.1.2. Gyvūnų ruošimas

Maždaug 24 h prieš bandymą nuo gyvūno reikia pašalinti kailį, jį trumpai nukerpant nugaros srityje. Reikia stengtis nenutrinti odos ir naudoti tik tuos gyvūnus, kurių oda yra sveika ir nepažeista.

Kai kurių veislių triušiai turi tankių plaukų vietas, kurios labiau matomos tam tikrais metų laikais. Tokios tankių plaukų vietos neturi būti naudojamos bandymui.

###### 1.4.1.3. Laikymo ir šėrimo sąlygos

Gyvūnai turi būti laikomi atskirai. Patalpos, kurioje laikomi bandomieji triušiai, temperatūra turi būti 20 °C ( $\pm 3$  °C). Nors santykinė oro drėgmė turėtų būti mažiausiai 30 % ir pageidautina ne didesnė kaip 70 %, išskyrus patalpos plovimo laiką, reikėtų siekti, kad ji būtų 50–60 %. Apšvietimas turi būti dirbtinis: 12 h šviesos ir 12 h tamsos. Gyvūnams šerti tinka įprastas laboratorijoje naudojamas pašaras, neribojant geriamo vandens kiekio.

##### 1.4.2. Bandymo eiga

###### 1.4.2.1. Bandomosios medžiagos uždėjimas

Bandomoji medžiaga uždinama ant mažo odos ploto (maždaug 6 cm<sup>2</sup>) ir uždengiama marlės tamponu, kuris tvirtinamas nedirginančia lipnia juosta. Jei tiesiogiai uždėti neįmanoma (pvz., skysčiai arba kai kurios pastos), bandomąją medžiagą reikėtų dėti ant marlės tampono, kuris būtų dedamas ant odos. Visą veikimo laikotarpį tamponas turi laisvai liesti odą, naudojant pusiau pralaidų tvarstį. Jei bandomoji medžiaga dedama ant tampono, jis dedamas ant odos taip, kad medžiaga gerai liestųsi su oda ir tolygiai pasiskirstytų ant jos. Gyvūnai neturi pasiekti tampono ir praryti arba įkvėpti bandomosios medžiagos.

Skystos bandomosios medžiagos paprastai naudojamos neskiestos. Bandant kietąsias medžiagas (kurios gali būti pulverizuojamos, jei manoma, kad tai būtina), bandomąją medžiagą reikėtų sudrėkinti kuo mažesniu vandens kiekiu (arba prirėkus kitu tinkamu nešikliu), kurio pakaktų geram sąlyčiui su oda užtikrinti. Kai nešiklis yra ne vanduo, galima nešiklio įtaka bandomosios medžiagos dirginamajam poveikiui turi būti kiek įmanoma mažesnė.

Pasibaigus veikimo laikotarpiui, kurio trukmė paprastai yra 4 h, bandomosios medžiagos likutis turi būti pašalintas, jei įmanoma, vandeniu arba kitu tinkamu tirpikliu, nepakeičiant odos reakcijos arba epidermio vientisumo.

###### 1.4.2.2. Dozės dydis

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

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

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

Kai po duomenų įrodomosios vertės analizės padaroma išvada, kad medžiaga yra ėsdinanti, daugiau bandymų su gyvūnais daryti nereikia. Didesnei daliai medžiagų, kurios, kaip spėjama, yra ėsdinančios, paprastai daugiau *in vivo* bandymų neprireikia. Tačiau tais atvejais, kai turimi duomenys atrodo nepakankamai įrodantys, galima daryti ribotą bandymą su gyvūnais, taikant šį būdą: ant gyvūno paeiliui dedami ne daugiau kaip trys tamponai.

Pirmasis tamponas nuimamas po trijų minučių. Jei jokios sunkios odos reakcijos nėra, dedamas antras tamponas, kuris nuimamas po valandos. Jei šioje stadijoje stebėjimai rodo, kad veikimą galima humaniškai pratęsti keturioms valandoms, dedamas trečias tamponas, kuris nuimamas po keturių valandų, ir odos reakcija įvertinama balais.

Jei esdinantis poveikis pastebimas po bet kurio iš trijų nuoseklių paveikimų, bandymas nedelsiant baigiamas. Jei esdinančio poveikio nėra, nuėmus paskutinį tamponą, gyvūnas stebimas 14 parų, jei esdinimo požymių neatsiranda anksčiau.

Tais atvejais, kai nesitikima, kad bandomoji medžiaga sukels esdinantį 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 esdinančio poveikio nėra, dirginantis poveikis arba neigiama reakcija turi būti patvirtinti naudojant ne daugiau kaip du papildomus gyvūnus, kiekvienam iš jų uždedant po vieną tamponą ir laikant jį keturias valandas. Jei dirginantis poveikis pastebimas darant pradinį bandymą, patvirtinamąjį bandymą galima daryti nuosekliu būdu arba veikiant du papildomus gyvūnus vienu metu. Išimtiniais atvejais, kai pradinis bandymas nedaromas, dviem arba trimis gyvūnams gali būti dedama po vieną tamponą keturioms valandoms. Kai naudojami du gyvūnai ir abiejų reakcija vienoda, toliau bandyti nereikia. Priešingu atveju atliekamas bandymas su trečiu gyvūnu. Neaiškias reakcijas gali tekti įvertinti naudojant papildomą gyvūną.

#### 1.4.2.5. *Stebėjimo laikotarpis*

Stebėjimo laikotarpio trukmės turi pakakti pastebėto poveikio grįžtamumui visiškai įvertinti. Tačiau bandymas turi būti nutrauktas bet kuriuo momentu, kai tik gyvūnui pasireiškia ilgalaikiai didelio skausmo arba kančios požymiai. Siekiant nustatyti poveikio grįžtamumą, gyvūnai po tamponų nuėmimo stebimi iki 14 parų. Jei grįžtamumas pastebimas anksčiau kaip po 14 parų, bandymas nutraukiamas tuo momentu.

#### 1.4.2.6. *Klinikiniai stebėjimai ir odos reakcijos įvertinimas balais*

Patikrinama, ar gyvūnai turi eritemos ir edemos požymių, o reakcija įvertinama balais po 60 minučių nuėmus tamponą ir vėliau – po 24, 48 ir 72 valandų. Darant pradinį bandymą su vienu gyvūnu, bandymo vieta taip pat tirama 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 esdinimas, poveikio grįžtamumui nustatyti stebėjimą gali tekti tęsti iki 14 parų. Be dirginamojo poveikio stebėjimo, turi būti išsamiai apibūdintas ir užrašytas bet koks vietinis toksinis poveikis, pvz., odos džiūvimas, ir bet koks neigiamas somatinis poveikis (pvz., poveikis, pasireiškiantis kaip klinikiniai toksiškumo požymiai, ir poveikis kūno masei). Neaiškiems pažeidimams išaiškinti galima būtų daryti histopatologinį tyrimą.

Odos reakcijos įvertinimas balais yra neišvengiamai subjektyvus. Siekiant labiau suderinti odos reakcijos įvertinimą balais ir padėti bandymo laboratorijoms ir visiems, kurie vykdo ir aiškina stebėjimus, juos vykdančias personalas turi būti atitinkamai apmokytas taikyti įvertinimo balais sistemą (žr. toliau pateiktą lentelę). Taip pat galėtų būti naudingas iliustruotas odos dirginimo ir kitų pažeidimų vertinimo vadovas (9).

## 2. **DUOMENYS**

### 2.1. REZULTATŲ PATEIKIMAS

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

### 2.2. REZULTATŲ ĮVERTINIMAS

Odos sudirginimo rezultatai turi būti įvertinti pagal pažeidimų tipą ir sunkumą bei atsižvelgiant į grįžtamumą arba į jo nebuvimą. Atskiri rezultatai nėra medžiagos dirginamųjų savybių absoliutusis įvertis, kadangi vertinamas ir kitas bandomosios medžiagos poveikis. Į šiuos atskirus rezultatus reikėtų žiūrėti kaip į pamatines vertes, kurios turi būti vertinamos kartu su visais kitais bandymo rezultatais.

Vertinant dirginamąsias savybes turėtų būti atsižvelgta į odos pažeidimų grįžtamumą. Kai reakcija, pvz., plikimas (ribotame plote), hiperkeratozė, hiperplazija ir pleiskanojimas, išlieka iki 14 parų stebėjimo laikotarpio pabaigos, bandomoji medžiaga priskiriama dirginančioms.

### 3. ATASKAITOS RENGIMAS

#### 3.1. BANDYMO ATASKAITA

BandyMO ataskaitoje turi būti pateikta ši informacija:

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

- ankstesnių bandymų atitinkamų duomenų aprašymas,
- duomenys, gauti kiekvienoje bandymų strategijos stadijoje,
- darytų *in vitro* bandymų aprašymas, įskaitant išsamią informaciją apie metodikas, rezultatus, gautus tiriant bandomąją ir (arba) etaloninę medžiagą,
- duomenų įrodomosios vertės analizė siekiant nustatyti, ar reikia atlikti *in vivo* bandymą.

Bandomoji medžiaga:

- tapatumas duomenys (pvz., CAS numeris, šaltinis, grynumas, žinomos priemonės, partijos numeris),
- fizinė būseną ir fizikinės bei cheminės savybės (pvz., pH, lakumas, tirpumas, stabilumas),
- sudėtis ir komponentų procentinė dalis, jei tai mišinys.

Nešiklis:

- tapatumas, koncentracija (jei taikytina), naudojamas tūris,
- nešiklio pasirinkimo pagrindimas.

Bandomieji gyvūnai:

- naudota rūšis ir veislė, kitų nei baltieji triušiai gyvūnų naudojimo pagrindimas,
- kiekvienos lyties gyvūnų skaičius,
- kiekvieno gyvūno masė bandymo pradžioje ir pabaigoje,
- amžius bandymo pradžioje,
- gyvūnų šaltinis, laikymo sąlygos, pašaras ir t. t.

BandyMO sąlygos:

- tampono dėjimo vietos ruošimo technika,
- išsami informacija apie tamponui naudojamas medžiagas ir tampono dėjimo techniką,



- išsami informacija apie bandomosios medžiagos ruošimą, dėjimą ir nuėmimą.

Rezultatai:

- kiekvieno gyvūno dirginimo ar ėsdinimo reakcijos baltų, gautų per kiekvieną matavimą, lentelių sudarymas,
- visų pastebėtų pažeidimų aprašymas,
- pastebėto dirginimo arba ėsdinimo tipo ir laipsnio pasakojamasis aprašymas ir visi histopatologinio tyrimo rezultatai,
- kito kartu su dirginimu arba ėsdinimu pasireiškiančio neigiamo vietinio (pvz., odos džiūvimo) ir somatinio poveikio aprašymas.

Rezultatų aptarimas.

#### 4. NUORODOS

- 1) Barratt, M.D., Castell, J.V., Chamberlain, M., Combes, R.D., Dearden, J.C., Fentem, J.H., Gerner, I., Giuliani, A., Gray, T.J.B., Livingston, D.J., Provan, W.M., Rutten, F.A.J.L., Verhaar, h.J.M., Zbinden, P. (1995) The Integrated Use of Alternative Approaches for Predicting Toxic Hazard. ECVAM Workshop Report 8. ATLA 23, p. 410–429.
- 2) Young, J.R., How, M.J., Walker, A.P., Worth W.M.H. (1988) Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substance Without Testing on Animals. Toxicol. *In Vitro*, 2, p. 19–26.
- 3) Worth, A.P., Fentem, J.H., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Liebsch, M. (1998) Evaluation of the proposed OECD Testing Strategy for skin corrosion. ATLA 26, p. 709–720.
- 4) ECETOC (1990) Monograph No. 15, „Skin Irritation“, European Chemical Industry, Ecology and Toxicology Centre, Brussels.
- 5) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Edsail, D.J., Holzhutter, h.G. and Liebsch, M. (1998) The ECVAM international validation study on in vitro tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxicology in Vitro 12, p. 483–524.
- 5a) Testing Method B.40 Skin Corrosion.
- 6) OECD (1996) OECD Test Guidelines Programme: Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods. Held in Solna, Sweden, 22–24 January 1996 (<http://www.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>).
- 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, (20T-2004). United States Environmental Protection Agency, Office of Pesticides and Toxic Substances, Washington, DC, August 1990.

[Paprašius, galima gauti OECD sekretoriате].

## I lentelė

**ODOS REAKCIJOS VERTINIMO BALAIS SKALĖ****Eritemos ir šašų atsiradimas**

Eritemos nėra .....	0
Labai nedidelė eritema (vos pastebima) .....	1
Aiškliai apibrėžta eritema .....	2
Nuo vidutinės iki didelės eritemos .....	3
Didelė eritema (jautienos raudonumo) arba šašų susidarymas, trukdantis įvertinti eritemą .....	4

Didžiausias įmanomas balas: 4

**Edemos atsiradimas**

Edemos nėra .....	0
Labai nedidelė edema (vos pastebima) .....	1
Nedidelė edema (plotelio kraštai aiškiai apibrėžti dėl iškilimo) .....	2
Vidutinė edema (iškilusi maždaug 1 mm) .....	3
Didelė edema (iškilusi daugiau kaip 1 mm ir išplitusi už veikiamo ploto ribų) .....	4

Didžiausias įmanomas balas: 4

Neaiškiems pažeidimams paaiškinti galima būtų daryti histopatologinį tyrimą.

## PRIEDĖLIS

## Nuosekliųjų bandymų strategija odos dirginimui ir ėsdinimui nustatyti

## BENDRIEJI KLAUSIMAI

Siekiant gauti išsamių mokslinių rezultatų ir rūpinantis gyvūnų gerove, svarbu be reikalo nenaudoti gyvūnų ir, kiek įmanoma, mažinti visus bandymus, kurie gyvūnams gali sukelti sunkias reakcijas. Prieš sprendžiant, ar daryti *in vivo* bandymus, turėtų būti įvertinta visa informacija apie medžiagos galimą ėsdinamąjį ar dirginamąjį poveikį odai. Jei jau yra pakankamai duomenų galimam bandomosios medžiagos ėsdinamajam arba dirginamajam poveikiui odai klasifikuoti, nereikia bandymų su laboratoriniais gyvūnais. Taigi taikant duomenų įrodomosios vertės analizę ir nuosekliųjų bandymų strategiją sumažėja būtinybė daryti *in vivo* bandymus, ypač jei tikėtina, kad medžiaga gali sukelti sunkias reakcijas.

Turimai informacijai apie medžiagų dirginamąjį ir ėsdinamąjį poveikį įvertinti rekomenduojama taikyti duomenų įrodomosios vertės analizę, kuri leistų spręsti, ar tokio poveikio galimybei apibūdinti reikia daryti papildomus tyrimus, išskyrus *in vivo* odos bandymus. Jei reikia papildomų tyrimų, atitinkamiems eksperimentiniams duomenims gauti, rekomenduojama taikyti nuosekliųjų bandymų strategiją. Norint gauti duomenų apie nebandytas medžiagas, reikalingų jų ėsdinamajam ar dirginamajam poveikiui odai įvertinti, reikėtų taikyti nuosekliųjų bandymų strategiją. Šiame priede aprašyta bandymų strategija buvo parengta OECD seminare (1) ir vėliau patvirtinta bei išplėsta kaip integruota darnioji pavojų dėl cheminių medžiagų poveikio žmonių sveikatai ir aplinkai klasifikavimo sistema (*Harmonised Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances*), 1998 m. lapkričio mėn. priimta 28-ajame jungtiniame cheminių medžiagų komiteto ir cheminių medžiagų darbo grupės posėdyje (2).

Nors ši nuosekliųjų bandymų strategija nėra sudėtinė B.4 bandymo metodo dalis, ji apibūdina rekomenduojamą būdą odos dirginimo ar ėsdinimo charakteristikoms nustatyti. Šis būdas atitinka geriausią praktiką ir yra odos dirginimo ar ėsdinimo *in vivo* bandymų etikos etalonas. Bandymo metode pateikiamos *in vivo* bandymų rekomendacijos ir apibūdinami veiksniai, į kuriuos reikėtų atkreipti dėmesį prieš pradėdant tokį bandymą. Strategijoje siūlomas būdas, kaip įvertinti turimus duomenis apie bandomųjų medžiagų odos dirginimo ar ėsdinimo savybes, kad būtų galima gauti reikiamų duomenų apie medžiagas, kurioms reikalingi papildomi tyrimai arba kurios nebuvo tirtos. Be to, rekomenduojama daryti įteisintus ir priimtus odos ėsdinimo ar dirginimo *in vitro* arba *ex vivo* bandymus esant konkrečioms aplinkybėms.

## ĮVERTINIMO IR BANDYMO STRATEGIJOS APRAŠYMAS

Siekiant nustatyti *in vivo* odos bandymų reikalingumą, prieš darant bandymus, kurie būtų nuosekliųjų bandymų strategijos dalis (schema), įvertinama visa turima informacija. Nors reikšmingos informacijos galima būtų gauti vertinant atskirus parametrus (pvz., pH ribines vertes), turėtų būti nagrinėjama turimos informacijos visuma. Sprendimui priimti turi būti daroma visų atitinkamų duomenų apie konkrečios medžiagos arba jos analogų poveikį įrodomosios vertės analizė, kuri pagrįstų priimamą sprendimą. Didžiausias dėmesys turėtų būti kreipiamas į duomenis apie medžiagą gautus tiriant žmones ir gyvūnus, o vėliau tirti *in vitro* arba *ex vivo* bandymų duomenis. Ėsdinančiųjų medžiagų *in vivo* bandymų reikėtų kiek įmanoma vengti. Toliau pateikiami bandymų strategijos veiksniai.

*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 pakanka duomenų apie giminingos struktūros medžiagų arba tokių medžiagų mišinių poveikį žmonėms ir gyvūnams, kad būtų galima įrodyti medžiagų gebą ėsdinti ar jautrinti odą, galima daryti prielaidą kad įvertinimui pateiktos bandomosios medžiagos poveikis bus toks pats. Tokiais atvejais bandomosios medžiagos nebūtina bandyti. Pagal nuosekliųjų bandymų strategiją neigiami duomenys apie giminingos struktūros medžiagų arba tokių medžiagų mišinių poveikį žmonėms ar gyvūnams nėra pakankamas įrodymas, kad medžiaga nėra ėsdinanti ar jautrinanti. Medžiagų geba ėsdinti ir dirginti odą nustatoma taikant įteisintus ir priimtus SAR metodus.

*Fizikinės ir cheminės savybės ir cheminis reaktyvumas (3 pakopa).* Medžiagos, turinčios ribines pH vertes, pvz.,  $\leq 2,0$  ir  $\geq 11,5$ , gali turėti didelį vietinį poveikį. Jei ribinė pH vertė yra pagrindinė savybė, pagal kurią medžiaga identifikuojama kaip odą ėsdinanti 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 nėra ėsdinanti arba dirginanti.

*In vitro arba ex vivo bandymų rezultatai (5 ir 6 pakopos).* Medžiagų, kurios, kaip įrodyta, veikia kaip ėsdinančios arba labai dirginančios darant patvirtinto tinkamumo ir priimtą *in vitro* arba *ex vivo* bandymą (6) (7), skirtą šiam konkrečiam poveikiui įvertinti, nereikia bandyti su gyvūnais. Galima daryti prielaidą, kad tokios medžiagos turės panašų sunkų poveikį *in vivo*.

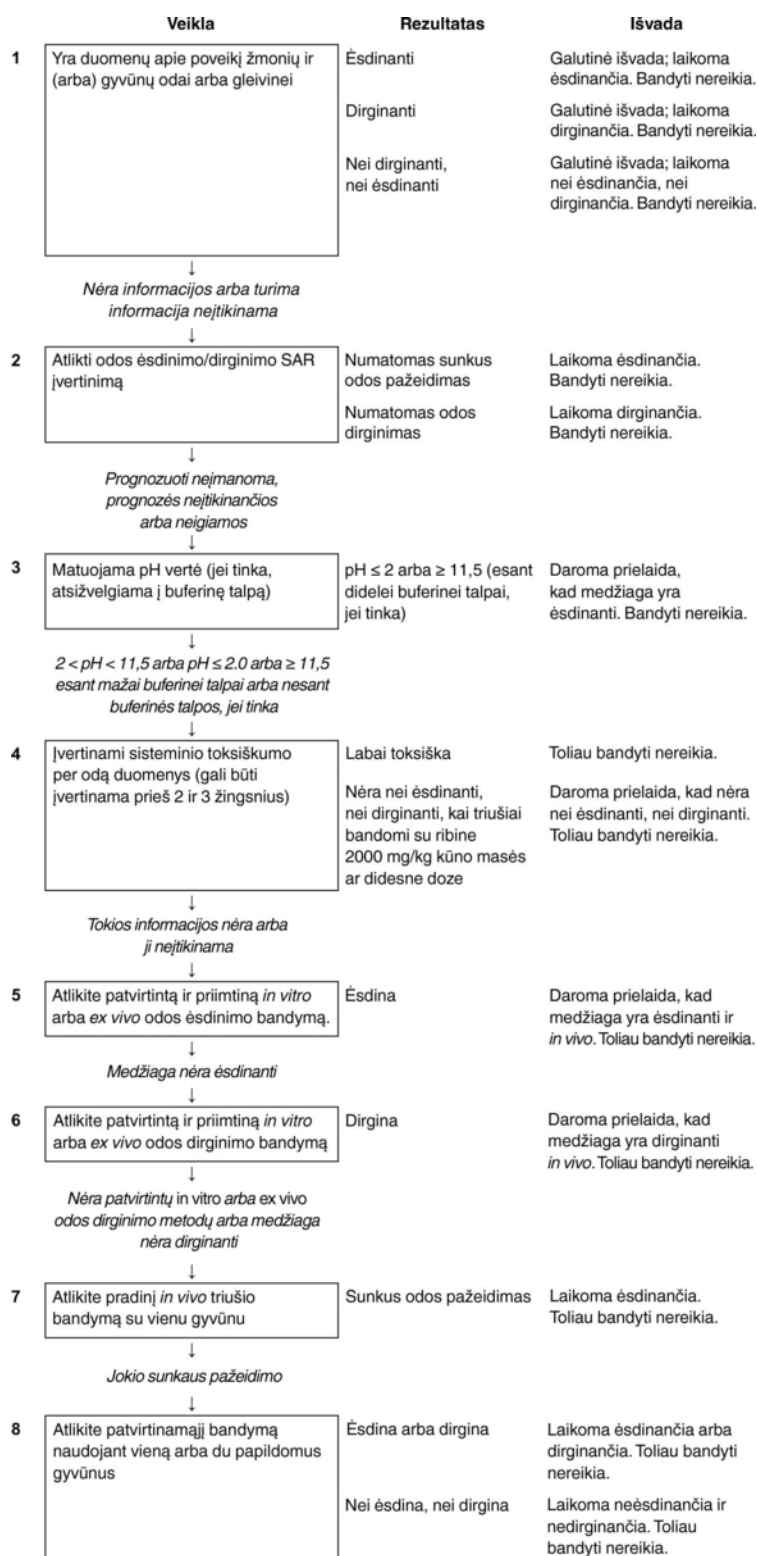
*Bandymas su triušiais in vivo (7 ir 8 pakopos).* Jei atlikus duomenų įrodomosios vertės analizę priimamas sprendimas daryti bandymą *in vivo*, jį reikėtų pradėti pradinio bandymu su vienu gyvūnu. Jei šio bandymo rezultatai rodo, kad medžiaga yra odą ėsdinanti, toliau bandyti nereikia. Jei darant pradinį 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/b\\_ackground.htm](http://www1.oecd.org/ehs/test/b_ackground.htm)).
- 2) OECD (1998). Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28<sup>th</sup> 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 prielaidą ATLA 26, p. 709–720.
- 4) Young, J.R., How, M.J., Walker, A.P., Worth, W.M.H. (1988). Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substances, Without Testing on Animals. *Toxic In Vitro*, 2 (1) p. 19–26.
- 5) Patil, S.M., Patrick, E., Maibach, H.I. (1996) Animal, Human, and In Vitro Test Methods for Predicting Skin Irritation, in: Francis N. Marzulli and Howard I. Maibach (editors): *Dermatotoxicology*. Fifth 1 1,5, 1–56032–356–6, Chapter 31, p. 411–436.
- 6) Testing Method B.40.
- 7) Fentem, J.H., identifiikuojama 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



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

## 1. METODAS

Šis metodas atitinka OECD TG 405 (2002).

## 1.1. ĮVADAS

Rengiant šį atnaujintą metodą ypatingas dėmesys buvo kreipiamas į galimą gyvūnų gerovės pagerinimą ir į visos turimos informacijos apie bandomąją medžiagą įvertinimą, siekiant išvengti nebūtinų bandymų su laboratoriniais gyvūnais. Pagal šį metodą rekomenduojama, prieš darant aprašytą medžiagos ūmaus akių ėsdinimo ar dirginimo bandymą *in vivo*, atlikti turimų atitinkamų duomenų įrodomosios vertės analizę (1). Jei duomenų nepakanka, jų galima gauti darant nuosekliųjų bandymą (2)(3). Į bandymo strategiją įtraukti šio metodo priedėlyje aprašyti įteisinti ir priimti *in vitro* bandymai. Be to, prieš numatant daryti *in vivo* akių bandymą akių ėsdinimui prognozuoti, rekomenduojama taikyti *in vivo* odos dirginimo ar ėsdinimo bandymą.

Siekiant užtikrinti ir duomenų mokslinį patikimumą, ir gyvūnų gerovę, *in vivo* bandymai neturėtų būti svarstomi tol, kol darant duomenų įrodomosios vertės analizę nebus įvertinti visi turimi duomenys, apibūdinantys galimą medžiagos ėsdinamąjį ar dirginamąjį poveikį akims. Tokius duomenis sudaro turimų žmonių tyrimų ir (arba) bandymų su laboratoriniais gyvūnais rezultatai, ėsdinimo ar dirginimo duomenys, gauti apie vieną arba kelias medžiagas, turinčias 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). Tokie tyrimai gali būti padaryti prieš duomenų įrodomosios vertės analizę arba kaip jos rezultatas.

Atlikus tokią analizę gali paaiškėti, kad reikia *in vivo* ištirti kai kurių medžiagų akių ėsdinimo ar dirginimo gebą. Visais šiais atvejais prieš svarstant *in vivo* akių bandymo atlikimą, pageidautina prieš tai atlikti medžiagos poveikio odai *in vivo* bandymą ir 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 bandymus, 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* bandymo, galima daryti *in vivo* akių ėsdinimo ar dirginimo bandymą.

Pirmenybė teikiama į šio metodo priedėlį įtrauktai nuosekliųjų bandymų strategijai, kurią sudaro įteisinti ir priimti *in vitro* arba *ex vivo* ėsdinimo ar dirginimo bandymai. Strategiją parengė ir vienbalsiai rekomendavo OECD 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 pradėdant *in vivo* bandymus. Tiriant naujas medžiagas, rekomenduojamas nuoseklusis bandymo būdas moksliskai pagrįstiems duomenims apie medžiagos ėsdinimo ar dirginimo savybes gauti. Tiriant esamas medžiagas, apie kurių odos ėsdinimo ar dirginimo savybes duomenų nepakanka, ši strategija turėtų būti taikoma tiek, kiek trūksta duomenų spragoms užpildyti. Kitokios bandymo strategijos arba metodikos taikymas arba sprendimas netaikyti nuosekliųjų bandymų metodo turi būti pagrįstas.

## 1.2. APIBRĖŽTYS

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

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

## 1.3. BANDYMO METODO PRINCIPAS

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

Gyvūnai, kuriems kurioje nors bandymo stadijoje pasireiškia nuolatiniai sunkių kančių ir (arba) skausmo požymiai, turi būti humaniškai numarunami, o medžiaga atitinkamai įvertinama. Kriterijai, pagal kuriuos priimamas sprendimas dėl humaniško gaištančių ir labai kenčiančių gyvūnų numaravimo, aprašyti (10) nuorodoje.

#### 1.4. BANDYMO METODO APRAŠYMAS

##### 1.4.1. Pasiruošimas *in vivo* bandymui

###### 1.4.1.1. Gyvūnų rūšies pasirinkimas

Tinkamiausias laboratorinis gyvūnas – baltasis triušis; naudojami sveiki, jauni ir suaugę triušiai. Kitų rūšių naudojimas turi būti pagrįstas.

###### 1.4.1.2. Gyvūnų ruošimas

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

###### 1.4.1.3. Laikymo ir šėrimo sąlygos

Gyvūnai turi būti laikomi atskiruose narveliuose. Patalpos, kurioje laikomi bandymo triušiai, temperatūra turi būti 20 °C ( $\pm 3$  °C). Nors santykinė oro drėgmė turėtų būti mažiausiai 30 % ir pageidautina ne didesnė kaip 70 %, išskyrus patalpos plovimo laiką, reikėtų siekti, kad ji būtų 50–60 %. Apšvietimas turi būti dirbtinis ir jo seka: 12 h šviesos ir 12 h tamsos. Gyvūnams šerti tinka įprastas laboratorinių gyvūnų pašaras, geriamojo vandens kiekis neribojamas.

##### 1.4.2. Bandymo eiga

###### 1.4.2.1. Bandomosios medžiagos dėjimas

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

###### 1.4.2.2. Akių plovimas

Įdėjus bandomosios medžiagos, bandomo gyvūno akių reikėtų neplauti mažiausiai 24 h, išskyrus kietąsias medžiagas (žr. 1.4.2.3.2 skirsnį) ir jei iš karto pasireiškia šėdinimo arba dirginimo poveikis. Po 24 h akis galima plauti, jei manoma, kad tai reikia daryti.

Nerekomenduojama naudoti pagalbinės gyvūnų grupės plovimo įtakai tirti, nebent tai yra mokslškai pagrįsta. Jei pagalbinės grupės reikia, naudojami du triušiai. Plovimo sąlygos turi būti kruopščiai aprašomos, pvz., plovimo laikas, plovimo tirpalo sudėtis ir temperatūra, trukmė, tūris ir plovimo greitis.

###### 1.4.2.3. Dozės dydis

###### 1.4.2.3.1. Skysčių bandymas

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

###### 1.4.2.3.2. Kietųjų medžiagų bandymas

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



#### 1.4.2.3.3. Aerozolių bandymas

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

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

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

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

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

#### 1.4.2.5. Vietinis nuskausminimas

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

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

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

#### 1.4.2.7. Stebėjimo laikotarpis

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

##### 1.4.2.7.1. Klinikiniai stebėjimai ir akių reakcijos įvertinimas balais

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

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



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

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

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

## 2. DUOMENYS

### 2.1. REZULTATŲ ĮVERTINIMAS

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

## 3. ATASKAITOS RENGIMAS

### 3.1. BANDYMO ATASKAITA

Bandymo ataskaitoje turi būti pateikta ši informacija:

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

- ankstesnių bandymų atitinkamų duomenų aprašymas,
- duomenys, gauti kiekvienoje bandymų strategijos stadijoje,
- darytų *in vitro* bandymų aprašymas, įskaitant išsamią informaciją apie procedūras, rezultatus, gautus tiriant bandomąją ar etaloninę medžiagas,
- daryto *in vivo* odos dirginimo ar ėsdinimo bandymo aprašymas, įskaitant gautus rezultatus,
- duomenų įrodomosios vertės analizė, kuria pagrįdžiamas *in vivo* bandymas.

Bandomoji medžiaga:

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

Nešiklis:

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

- nešiklio pasirinkimo pagrindimas.

Bandomieji gyvūnai:

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

Rezultatai:

- metodo, taikyto dirginimui kiekvienu stebėjimo momentu įvertinti balais (pvz., rankinė plyšinė lempa, biologinis mikroskopas, fluoresceinas), aprašymas,
- kiekvieno gyvūno dirginimo ar ėsdinimo reakcijos duomenų, gautų kiekvienu stebėjimo momentu iki gyvūno pašalinimo iš bandymo, lentelių sudarymas,
- pastebėto dirginimo arba ėsdinimo pobūdžio ir laipsnio pasakojamasis aprašymas,
- visų kitų akies pažeidimų aprašymas (pvz., vaskuliarizacija, panuso susidarymas, sąaugų, dėmių atsiradimas),
- bet kokio ne akims daromo neigiamo vietinio ir somatinio poveikio aprašymas, visi histopatologinio tyrimo rezultatai, jei yra.

Rezultatų aptarimas.

### 3.2. REZULTATŲ AIŠKINIMAS

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

Reikia stengtis į rezultatų aiškinimą neįtraukti antrinės infekcijos 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>).
- 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>).

## 1 lentelė

**Akių pažeidimo vertinimo balais skalė****Ragena**

Drumstis: tankumo laipsnis (duomenys imami iš tankiausios sritys) (\*)

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

Didžiausias įmanomas balas: 4

**PASTABOS**

(\*) Turi būti nurodyta ragenos drumsties sritis.

**Rainelė**

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

Didžiausias įmanomas balas: 2

**Junginė**

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

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

Didžiausias įmanomas balas: 3

**Chemozė**

Paburkimas (taikoma vokams ir (arba) niktitacinėms membranoms)

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

Didžiausias įmanomas balas: 4

## PRIEDĖLIS

## Nuosekliųjų bandymų strategija akių dirginimui ir ėsdinimui nustatyti

## BENDRIEJI KLAUSIMAI

Siekiant gauti išsamių mokslinių rezultatų ir rūpinantis gyvūnų gerove, svarbu be reikalo nenaudoti gyvūnų ir, kiek įmanoma, mažinti visus bandymus, kurie gyvūnams gali iššaukti sunkias reakcijas. Prieš sprendžiant, ar daryti *in vivo* bandymus, turėtų būti įvertinta visa informacija apie medžiagos galimą ėsdinamąjį ar dirginamąjį poveikį odai. Jei jau yra pakankamai duomenų galimam bandomosios medžiagos ėsdinamajam arba dirginamajam poveikiui odai klasifikuoti, nereikia bandymų su laboratoriniais gyvūnais Taigi taikant duomenų įrodomosios vertės analizę ir nuosekliųjų bandymų strategiją sumažėja būtinybė daryti *in vivo* bandymus, ypač jei tikėtina, kad medžiaga gali iššaukti sunkias reakcijas.

Turimai informacijai apie medžiagų dirginamąjį ir ėsdinamąjį poveikį akims įvertinti rekomenduojama taikyti duomenų įrodomosios vertės analizę, kuri leistų spręsti, ar tokio poveikio galimybei apibūdinti reikia daryti papildomus tyrimus, išskyrus *in vivo* akių bandymus. Jei reikia papildomų tyrimų, atitinkamiems eksperimentiniams duomenims gauti rekomenduojama taikyti nuosekliųjų bandymų strategiją. Norint gauti duomenų apie nebandytas medžiagas, reikalingų jų ėsdinamajam ar dirginamajam poveikiui odai įvertinti, reikėtų taikyti nuosekliųjų bandymų strategiją. Šiame priede aprašyta bandymų strategija buvo parengta OECD seminare (1). Vėliau ji buvo patvirtinta bei išplėsta kaip integruota darnioji pavojų dėl cheminių medžiagų poveikio žmonių sveikatai ir aplinkai klasifikavimo sistema, 1998 m. lapkričio mėn. priimta 28-ajame jungtiniame cheminių medžiagų komiteto ir cheminių medžiagų darbo grupės posėdyje (2).

Nors ši nuosekliųjų bandymų strategija nėra sudėtinė B.5 bandymo metodo dalis, ji apibūdina rekomenduojamą būdą akių dirginimo ar ėsdinimo charakteristikoms nustatyti. Šis būdas atitinka geriausią praktiką ir yra akių dirginimo ar ėsdinimo *in vivo* bandymų etikos etalonas. Bandymo metode pateikiamos *in vivo* bandymų rekomendacijos ir apibendrinami veiksniai, į kuriuos reikėtų atkreipti dėmesį prieš pradėdant tokių bandymą. Nuosekliųjų bandymų strategijoje siūlomas duomenų įrodomosios vertės analizės būdas, kuris leistų įvertinti turimus duomenis apie bandomųjų medžiagų akių dirginimo ar ėsdinimo savybes, kad būtų galima nuosekliai gauti reikiamų duomenų apie medžiagas, kurioms reikalingi papildomi tyrimai arba kurios nebuvo tirtos. Strategijoje nurodoma iš pradžių daryti įteisintus ir priimtus *in vitro* arba *ex vivo* bandymus ir tik po to naudoti odos ėsdinimo ar dirginimo bandymo metodą B.4 konkrečiomis aplinkybėmis (3) (4).

## ĮVERTINIMO IR BANDYMO STRATEGIJOS APRAŠYMAS

Siekiant nustatyti *in vivo* akių bandymų reikalingumą, prieš darant bandymus, kurie būtų nuosekliųjų bandymų strategijos dalis (schema), įvertinama visa turima informacija. Nors reikšmingos informacijos galima būtų gauti vertinant atskirus parametrus (pvz., pH ribines vertes), turėtų būti nagrinėjama turimos informacijos visuma. Sprendimui priimti turėtų būti daroma visų atitinkamų duomenų apie konkrečios medžiagos arba jos struktūrinių analogų poveikį įrodomosios vertės analizė, kuri pagrįstų priimamą sprendimą. Didžiausias dėmesys turėtų būti kreipiamas į duomenis apie medžiagą, gautus tiriant žmones ir gyvūnus, o vėliau tirti *in vitro* arba *ex vivo* bandymų duomenis. Ėsdinančiųjų medžiagų *in vivo* bandymų reikėtų kiek įmanoma vengti. Toliau pateikiami bandymų strategijos veiksniai.

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

*Struktūros ir aktyvumo ryšių (SAR) analizė (2 pakopa)*. Analizuojami giminingą struktūrą turinčių medžiagų bandymo rezultatai, jei tokie būtų. Kai pakanka duomenų apie giminingos struktūros medžiagų arba tokių medžiagų mišinių poveikį žmonėms ir gyvūnams, kad būtų galima įrodyti medžiagų gebą ėsdinti ar jautrinti akis, galima daryti prielaidą kad įvertinimui pateiktos bandomosios medžiagos poveikis bus toks pats. Tokiais atvejais bandomosios medžiagos nebūtina bandyti. Pagal nuosekliųjų bandymų strategiją neigiami duomenys apie giminingos struktūros medžiagų arba tokių medžiagų mišinių poveikį žmonėms ar gyvūnams nėra pakankamas įrodymas, kad medžiaga nėra ėsdinanti ar jautrinanti. Medžiagų geba ėsdinti ir dirginti odą bei akis turi būti nustatoma taikant įteisintus ir priimtus SAR metodus.

*Fizikinės ir cheminės savybės ir cheminis reaktyvumas (3 pakopa)*. Medžiagos, turinčios ribines pH vertes, pvz.,  $\leq 2,0$  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.

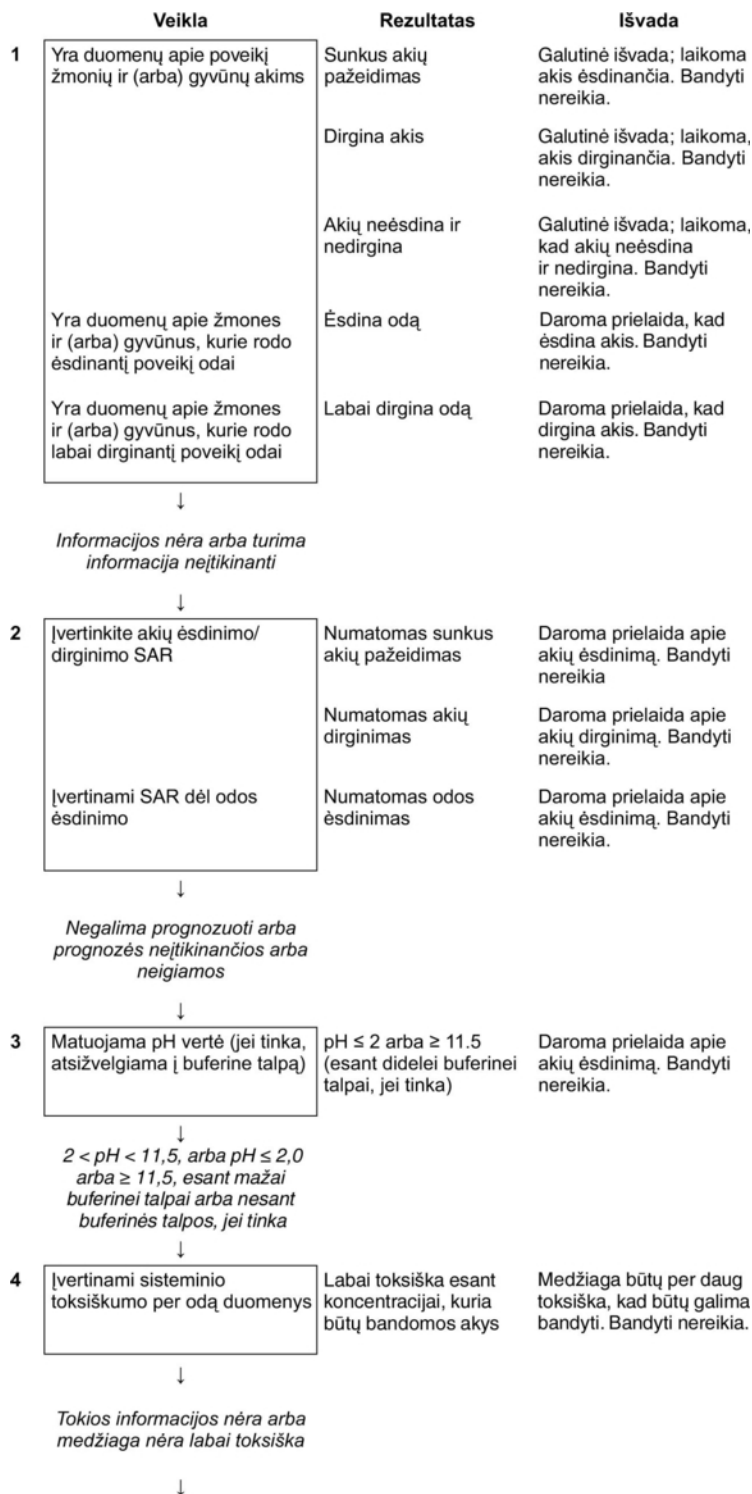
*Bandymas su traušiais in vivo (8 ir 9 pakopos).* *In vivo* akių bandymą reikėtų pradėti darant pradinį bandymą su vienu gyvūnu. Jei šio bandymo rezultatai rodo, kad medžiaga yra labai dirginanti arba ėsdinanti akis, toliau bandyti nereikia. Jei darant pradinį bandymą ėsdinimo arba sunkus dirginantis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

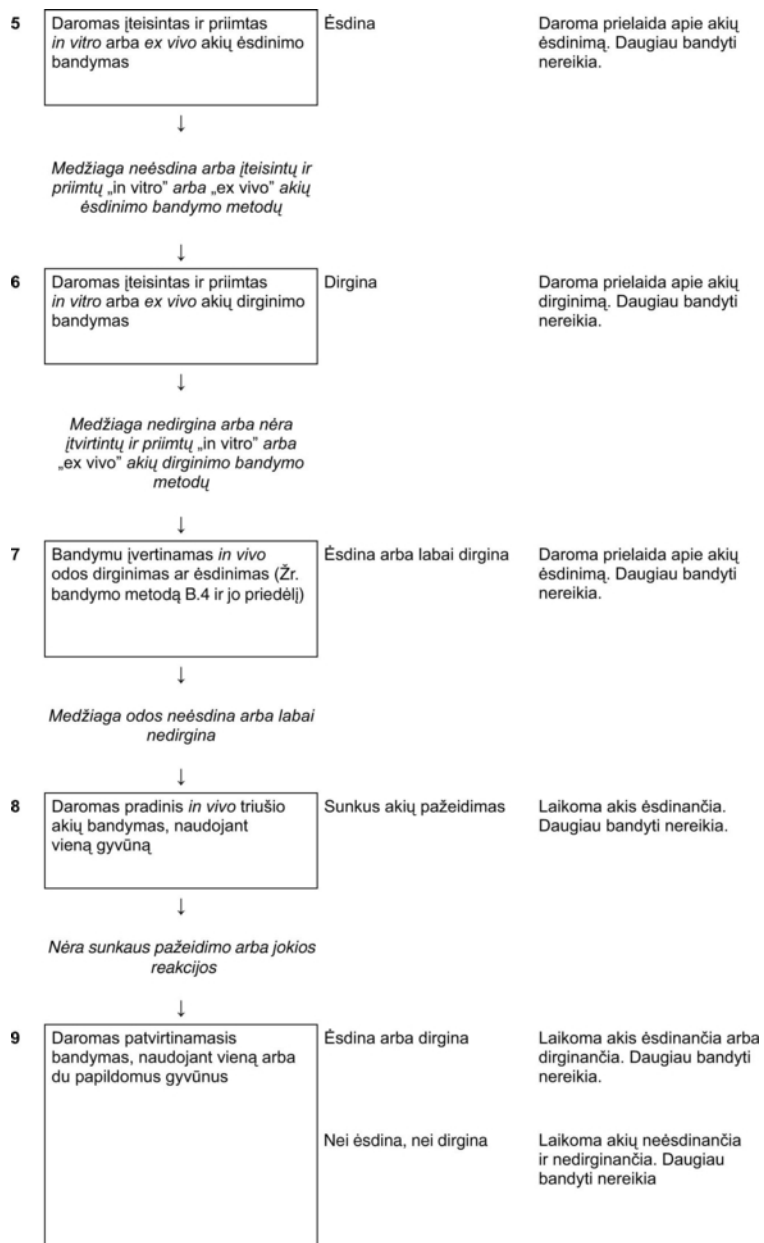
## NUORODOS

- 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., Edsall, 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.6. ODOS JAUTRINIMAS

## 1. METODAS

## 1.1. ĮVADAS

*Pastabos*

Bandymų tikslumas ir gebėjimas jais aptikti potencialius žmogaus odos alergenų laikomi svarbiais klasifikuojant visuomenės sveikatai reikšmingą toksiškumą.

Nėra vieno bandymų metodo, kuriuo būtų galima tinkamai nustatyti visas odą jautrinti galinčias medžiagas ir kuris tiktų visoms medžiagoms tirti.

Pasirenkant bandymą, reikia atsižvelgti į medžiagos fizikines savybes, įskaitant jos gebėjimą prasiskverbti per odą.

Naudojant jūrų kiaulytės sukurti dviejų tipų bandymai: adjuvantiniai bandymai, kuriais alerginės reakcijos sustiprinamos bandomąją medžiagą ištirpinant (ar padarant suspensiją) Freundo pilname adjuvante (FPA), ir neadjuvantiniai bandymai.

Tikėtina, kad adjuvantiniais bandymais tiksliau nustatomos žmogaus odą jautrinti galinčios medžiagos negu tais bandymais, kuriems nenaudojamas Freundo pilnas adjuvantas. Todėl šiems bandymams teikiama pirmenybė.

Jūrų kiaulytės maksimizacijos bandymas (JKMB) yra plačiai naudojamas adjuvantinis bandymas. Nors medžiagos gebėjimui sukelti odos jautrinimo reakciją nustatyti gali būti naudojami ir kiti metodai, JKMB laikomas tinkamiausiu adjuvantiniu bandymu.

Manoma, kad neadjuvantiniai bandymai (plačiausiai naudojamas *Buehlerio* bandymas) daugelio medžiagų klasių atžvilgiu yra mažiau tikslūs.

Kartais gali būti svarių priežasčių rinktis *Buehlerio* bandymo metodą, pagal kurį naudojamos antodinės aplikacijos, o ne įodinės injekcijos, kaip yra jūrų kiaulytės maksimizacijos bandymo atveju. Jei naudojamas *Buehlerio* bandymas, tai reikėtų mokslškai pagrįsti.

Šiame metode aprašyti jūrų kiaulytės maksimizacijos bandymas (JKMB) ir *Buehlerio* bandymas. Mokslškai pagrįstus, galima naudoti ir kitus standartizuotus metodus.

Jei atlikus pripažintą atrankos bandymą gaunamas teigiamas rezultatas, bandomoji medžiaga gali būti apibūdinama kaip potencialus alergenas, ir tolesnio jūrų kiaulytės bandymo gali nereikėti. Tačiau jei atlikus tokį bandymą gaunamas neigiamas rezultatas, turi būti atliktas jūrų kiaulytės bandymas, remiantis šiame metode aprašyta procedūra.

Taip pat žiūrėkite Bendrojo įvado B dalį.

## 1.2. APIBRĖŽTYS

*Odos jautrinimas* (alerginis kontaktinis dermatitas) – imuninės kilmės odos reakcija į medžiagą. Žmonėms atsakas gali pasireikšti odos niežėjimu, eritema, edema spuogeliais, pūslelėmis, pūslelėmis ar jų deriniu. Gyvūnų odos reakcijos gali skirtis ir gali pasireikšti tik paraudimu ir patinimu.

*Indukcinis poveikis* – eksperimentinis organizmo veikimas bandomąja medžiaga, siekiant sukelti organizmo padidėjusio jautrumo būklę.

*Indukcinis laikotarpis* – bent vienos savaitės laikotarpis po indukcinio poveikio, kurio metu gali išsivystyti organizmo padidėjusio jautrumo būklė.

*Provokacinis poveikis* – pakartotinis organizmo veikimas bandomąja medžiaga po indukcinio laikotarpio, siekiant nustatyti, ar organizmo reakcija yra jautresnė.

## 1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Bandymams naudojamos įrangos jautrumas ir patikimumas turi būti įvertinamas kas šešis mėnesius naudojant žinomas medžiagas, sukeliančias silpną arba vidutinio stiprumo odos jautrinimo poveikį.

Tinkamai atlikus bandymą su silpna arba vidutinio stiprumo jautrinančia medžiaga (sensibilizatoriumi), reikėtų tikėtis, kad reakcija pasireikš bent 30 % gyvūnų adjuvantinio bandymo atveju ir bent 15 % gyvūnų neadjuvantinio bandymo atveju.

Pirmenybė teikiama šioms medžiagoms:

CAS Nr.	Einecs Nr.	Einecs pavadinimas	Įprastas pavadinimas
101-86-0	202-983-3	cinamono rūgšties heksialdehidas	cinamono rūgšties heksialdehidas
149-30-4	205-736-8	benztiazol-2-tiolis (2-merkaptobenzotiazolas)	kaptaksas
94-09-7	202-303-5	benzokainas	norkainas

Gali būti aplinkybių, kai tinkamai pagrindus galima naudoti kitas kontrolines medžiagas.

## 1.4. BANDYMO METODO PRINCIPAS

Iš pradžių bandomieji gyvūnai paveikiami bandomosios medžiagos įodinėmis injekcijomis ir (arba) antodinėmis aplikacijomis (indukcinis poveikis). Praėjus 10–14 dienų poilsio laikotarpiui (indukciniam laikotarpiui), kurio metu gali pasireikšti imuninis atsakas, gyvūnai paveikiami provokacine doze. Bandomųjų gyvūnų odos reakcijos į provokacinį poveikį apimtis ir laipsnis yra lyginami su kontrolinių gyvūnų, kurie patyrė imitacinę (nejautrinančios medžiagos) indukcijos ir provokacijos veikimą.

## 1.5. BANDYMO METODO APRAŠYMAS

Jeigu bandomąją medžiagą būtina nuplauti, reikia naudoti vandenį ar tinkamą tirpiklį, kad nepakistų gauta reakcija ar nebūtų pažeistas odos vientisumas.

## 1.5.1. Jūrų kiaulytės maksimizacijos bandymas (JKMB)

## 1.5.1.1. Pasiruošimas

Sveikos jaunos suaugusios baltosios (albinosės) jūrų kiaulytės mažiausiai 5 dienas prieš bandymą aklimatizuojamos laboratorijos sąlygomis. Gyvūnai prieš bandymą atsitiktinės atrankos būdu paskirstomi į bandomo grupes. Kailis gali būti pašalinamas žirkėmis, nuskutant ar chemine depiliacija, atsižvelgiant į bandymo metodą. Reikia stengtis nesubraižyti odos. Gyvūnai pasveriami prieš bandymo pradžią ir jo pabaigoje.

## 1.5.1.2. Bandymo sąlygos

## 1.5.1.2.1. Bandomieji gyvūnai

Naudojamos įprastinės laboratorinės baltųjų jūrų kiaulyčių veislės.

## 1.5.1.2.2. Skaičius ir lytis

Gali būti naudojami patinai ir (arba) patelės. Patelės turi būti neturėjusios palikuonių ir neapvaisintos.

Bandomojoje grupėje turi būti mažiausiai 10 gyvūnų, o kontrolinėje mažiausiai 5. Jeigu ištirta mažiau negu 20 bandomųjų ir 10 kontrolinių jūrų kiaulyčių ir neįmanoma nustatyti, ar bandomoji medžiaga yra odą jautrinanti medžiaga, pirmą kartą rekomenduojama ištirti daugiau gyvūnų, kad iš viso susidarytų 20 bandomųjų ir 10 kontrolinių gyvūnų.

## 1.5.1.2.3. Dozės

Kiekvienam indukciniam poveikiui sukelti naudojama gerai organizmo toleruojama didžiausia bandomosios medžiagos koncentracija, sukelianti nuo silpno iki vidutinio stiprumo odos sudirginimą. Provokaciniam poveikiui naudojama didžiausia odos nedirginanti bandomosios medžiagos koncentracija. Jeigu būtina, tinkamos koncentracijos nustatomos atliekant parengtinį bandymą su dviem ar trim gyvūnais, jei nėra kitos informacijos. Šiam tikslui galima būtų panaudoti ir FPA paveiktus gyvūnus.

1.5.1.3. *Bandymo eiga*

## 1.5.1.3.1. Indukcija

0 diena – bandomoji grupė

Menčių srityje, nuo kurios pašalintas kailis, atliekamos 0,1 ml tūrio trys poros įodinių injekcijų taip, kad kiekvienos poros viena injekcija būtų kitoje nugaros vidurio pusėje.

1 injekcija: FPA/vandens ar fiziologinio tirpalo mišinys santykiu 1:1 (v/v)

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

3 injekcija: bandomosios medžiagos pasirinkta koncentracija, pagaminta panaudojant mišinį FPA/vanduo ar fiziologinis tirpalas santykiu 1:1 (v/v).

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

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

0 diena – kontrolinė grupė

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

1 injekcija: FPA/vandens ar fiziologinio tirpalo mišinys santykiu 1:1 (v/v)

2 injekcija: neskiestas nešiklis

3 injekcija: nešiklio 50 % tirpalas (v/v), pagamintas panaudojant mišinį – FPA/vanduo ar fiziologinis tirpalas santykiu 1:1 (v/v).

5–7 diena – bandomoji ir kontrolinės grupės

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

6–8 diena – bandomoji grupė

Nuo bandomojo ploto vėl pašalinamas kailis. Filtravimo popierius (2 × 4 cm) sudrėkinamas bandomojoje medžiagoje, ištirpintoje tinkamame nešiklyje, uždedamas ant bandomojo ploto ir fiksuojamas okliuzine (nepralaidžia) tvarstomąja medžiaga 48 valandoms. Nešiklio pasirinkimą reikia pagrįsti. Kietosios medžiagos yra susmulkinamos į miltelius ir išmaišomos nešiklyje. Skysčiai gali būti naudojami neskiesti, jei tinkama.

6–8 diena – kontrolinė grupė

Nuo bandomojo ploto vėl pašalinamas kailis. Viskas atliekama tai pat kaip ir bandomojoje grupėje, vietoj bandomosios medžiagos naudojant nešiklį; vėliau viskas fiksuojama okliuzine (nepralaidžia) tvarstomąja medžiaga 48 valandoms.

#### 1.5.1.3.2. Provokacija

20–22 diena – bandomoji ir kontrolinė grupės

Nuo bandomųjų ir kontrolinių gyvūnų šonų pašalinamas kailis. Bandomąja medžiaga sudrėkintas tamponas arba gaubtelis, uždedamas ant vieno gyvūnų šono. Jeigu reikia, ant kito šono uždedamas nešikliu sudrėkintas tamponas. Tamponas arba gaubtelis fiksuojami nepralaidžiu tvarsčiu 24 valandoms.

#### 1.5.1.3.3. Stebėjimas ir vertinimas: bandomoji ir kontrolinė grupės

- praėjus maždaug 21 valandai po tampono nuėmimo, provokacinis plotas nuvalomas, trumpai nukerpamas ir (arba) nuskutamas, o jeigu būtina, depiliuojamas,
- maždaug po 3 valandų (praėjus maždaug 48 valandoms nuo provokacijos pradžios) apžiūrima odos reakcija ir įvertinama balais taip, kaip paaiškinta priedėlyje,
- praėjus maždaug 24 valandoms po šio apžiūrėjimo, odos reakcija apžiūrima antrą kartą (72 valandos) ir dar kartą įvertinama balais.

Skatinama apžiūrėti bandomuosius ir kontrolinius gyvūnus aklos atrankos būdu.

Jeigu reikia išsiaiškinti per pirmąją provokaciją pastebėtus rezultatus, praėjus maždaug vienai savaitei svarstyti-  
nas antros provokacijos (t. y. reprovokacija) atlikimas, jei reikia, su nauja kontroline grupe. Reprovokaciją taip pat galima atlikti su pradine kontroline grupe.

Dėl indukcinį ir provokacinių procedūrų kilusios visos odos ir bet kokios neįprastos, taip pat ir somatinės, reakcijos stebimos ir įvertinamos pagal Magnussono/Kligmano skalę (žr. priedėlį). Kitos procedūros, pvz., histopatologinis tyrimas, odos raukšlės storio matavimas, gali būti atliekamos siekiant išsiaiškinti neaiškias reakcijas.

### 1.5.2. Buehlerio bandymas

#### 1.5.2.1. Pasiruošimas

Sveikos jaunos suaugusios baltosios (albinosės) jūrų kiaulytės mažiausiai 5 dienas prieš bandymą aklimatizuojamos laboratorijos sąlygomis. Gyvūnai prieš bandymą atsitiktinės atrankos būdu paskirstomi į bandymo grupes. Kailis gali būti pašalinamas žirkklėmis, nuskutant ar chemine depiliacija, atsižvelgiant į bandymo metodą. Reikia stengtis nesubraižyti odos. Gyvūnai pasveriami prieš bandymo pradžią ir jo pabaigoje.

#### 1.5.2.2. Bandymo sąlygos

##### 1.5.2.2.1. Bandomieji gyvūnai

Naudojamos įprastinės laboratorinės baltųjų jūrų kiaulyčių veislės.

##### 1.5.2.2.2. Skaičius ir lytis

Gali būti naudojami patinai ir (arba) patelės. Patelės turi būti neturėjusios palikuonių ir neapvaisintos.

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

##### 1.5.2.2.3. Dozės

Kiekvienam indukciniam poveikiui naudojama didžiausia bandomosios medžiagos koncentracija, sukianti silpną ne pernelyg didelį odos sudirginimą. Provokaciniam poveikiui naudojama didžiausia odos nedirginanti

bandomosios medžiagos koncentracija. Jeigu būtina, tinkamos koncentracijos nustatomos atliekant parengtini bandymą su dviem ar trim gyvūnais.

Vandenyje tirpioms bandomosioms medžiagoms kaip nešiklis naudojamas vanduo ar atskieta nedirginanti aktyvioji paviršiaus medžiaga. Kitoms bandomosioms medžiagoms kaip nešiklis indukcijos etape naudojamas 80 % etanolis/vanduo, o provokacijos etape – acetonas.

### 1.5.2.3. *Bandymo eiga*

#### 1.5.2.3.1. Indukcija

0 diena – bandomoji grupė

Nuo vieno gyvūno šono pašalinamas kailis (trumpai nukerpamas). Bandymui naudojamas tamponas turi būti prisigėręs bandomosios medžiagos, ištirpintos tinkamame nešiklyje (nešiklio pasirinkimą reikia pagrįsti; skystos bandomosios medžiagos gali būti neskiečiamos, jei tinkama).

Bandymui naudojamas tamponas (kompresas) pridedamas prie odos ir 6 h nepralaidžiu tvarščiu arba gaubteliu ir tinkama tvarstomąja medžiaga laikomas taip, kad liestųsi su oda.

Bandymui naudojamas tamponas turi būti nepralaidus. Tinka maždaug 4–6 cm<sup>2</sup> vatos diskelis ar kvadratėlis. Siekiant užtikrinti okliuziją, gyvūno judesius geriausia apriboti tinkamomis priemonėmis. Jei gyvūnas subintuojamas, gali tekti jį paveikti bandomąja medžiaga papildomai.

0 diena – kontrolinė grupė

Nuo vieno gyvūno šono pašalinamas kailis (trumpai nukerpamas). Viskas atliekama tai pat kaip ir bandomojoje grupėje, vietoj bandomosios medžiagos naudojant tik nešiklį. Bandymui naudojamas tamponas arba gaubtelis fiksuojamas tinkama tvarstomąja medžiaga 6 valandoms. Jeigu įrodoma, kad imitacinė kontrolinė grupė nebūtina, gali būti naudojama paprasta kontrolinė grupė.

6–8 ir 13–15 diena – bandomoji ir kontrolinė grupės

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

#### 1.5.2.3.2. Provokacija

27–29 diena – bandomoji ir kontrolinė grupės

Nuo netirto bandomųjų ir kontrolinių gyvūnų šono pašalinamas kailis (trumpai nukerpamas). Ant bandomųjų ir kontrolinių gyvūnų netirto šono užpakalinės dalies dedamas nepralaidus tamponas arba gaubtelis su reikiamu kiekiu bandomosios medžiagos (didžiausios nedirginančios koncentracijos).

Kada reikia, ant bandomųjų ir kontrolinių gyvūnų netirto šono priekinės dalies taip pat dedamas nepralaidus tamponas arba gaubtelis, prisigėręs tik nešiklio. Viskas fiksuojama tinkama tvarstomąja medžiaga 6 valandoms.

#### 1.5.2.3.3. Stebėjimas ir vertinimas

- praėjus maždaug 21 valandai po tvarščio nuėmimo, nuo provokacinio ploto pašalinamas kailis,
- maždaug po 3 valandų (praėjus maždaug 30 valandų nuo provokacijos pradžios) apžiūrima odos reakcija ir įvertinama balais taip, kaip paaiškinta priedėlyje,
- praėjus maždaug 24 valandoms po 30 valandų apžiūrėjimo (maždaug 54 valandoms po provokacinio tampono uždėjimo), odos reakcija apžiūrima antrą kartą ir įvertinama balais.

Skatinama apžiūrėti bandomuosius ir kontrolinius gyvūnus aklos atrankos būdu.

Jeigu reikia išsiaiškinti per pirmąją provokaciją pastebėtus rezultatus, praėjus maždaug vienai savaitei svarstomas antros provokacijos (t. y. reprovokacijos) atlikimas, jei reikia, su nauja kontroline grupe. Reprovokaciją taip pat galima atlikti su pradine kontroline grupe.

Dėl indukcinų ir provokacinių procedūrų kilusios visos odos ir bet kokios neįprastos, taip pat ir somatinės, reakcijos stebimos ir įvertinamos pagal Magnussono/Kligmano skalę (žr. priedėlį). Kitos procedūros, pvz., histopatologinis tyrimas, odos raukšlės storio matavimas, gali būti atliekamos siekiant išsiaiškinti neaiškias reakcijas.

## 2. DUOMENYS (JKMB ir Buehlerio bandymo)

Duomenys turi būti suvesti į lentelę, kurioje nurodoma kiekvieno gyvūno odos reakcija nustatyta per kiekvieną apžiūrą.

## 3. ATASKAITOS PATEIKIMAS (JKMB ir Buehlerio bandymo)

Jeigu prieš bandymą su jūrų kiaulytėmis buvo atliktas atrankos bandymas, jo aprašymas arba nuoroda (pvz., vietinio limfinio mazgo bandymas, pelės ausies patinimo bandymas (angl. MEST)), įskaitant išsamią informaciją apie procedūrą, turi būti pateikiami kartu su gautais rezultatais apie bandomąsias ir kontrolines medžiagas.

### Bandymo ataskaita (JKMB ir Buehlerio)

Bandymo ataskaitoje, jei įmanoma, turėtų būti pateikiama ši informacija.

#### *Bandomieji gyvūnai:*

- naudotos jūrų kiaulyčių veislės,
- gyvūnų skaičius, amžius ir lytis,
- gyvūnų šaltinis, laikymo sąlygos, pašarai ir kt.,
- kiekvieno gyvūno kūno masė bandymo pradžioje.

#### *Bandymo sąlygos:*

- veikiamo plotelio paruošimo būdas,
- informacija apie tamponui naudotą medžiagą ir tvirtinimo būdą,
- parengtinio bandymo rezultatai su išvada apie indukcijai ir provokacijai naudotinas koncentracijas,
- informacija apie bandomosios medžiagos paruošimą, aplikaciją ir nuėmimą,
- nešiklio pasirinkimo pagrindimas,
- nešiklio ir bandomosios medžiagos koncentracijos, naudotos indukciniam ir provokaciniam poveikiui sukelti, taip pat bendras indukcijai ir provokacijai sunaudotas medžiagos kiekis.

#### *Rezultatai:*

- rezultatų suvestinė su paskutiniu įrangos jautrumo ir patikimumo patikrinimu (žr. 1.3), be to, informacija apie panaudotą medžiagą, koncentraciją ir nešiklį,
- kiekvieno gyvūno įvertinimas balais kartu su vertinimo sistema,

- pastebėto poveikio pobūdžio ir laipsnio pasakojamasis aprašymas,
- histopatologiniai duomenys.

*Rezultatų aptarimas.*

*Išvados.*

#### 4. **NUORODOS**

Šis metodas atitinka OECD TG 406.

*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.7. KARTOTINIŲ DOZIŲ (28 DIENŲ) TOKSIŠKUMAS (PER VIRŠKINAMĄJĮ TRAKTĄ)****1. METODAS****1.1. ĮVADAS**

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

**1.2. APIBRĖŽTYS**

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

**1.3. BANDYMO METODO PRINCIPAS**

Kelioms eksperimentinių gyvūnų grupėms 28 dienas kasdien per virškinamąjį traktą duodamos nuoseklios bandomosios medžiagos dozės – po vieną dozę vienai grupei. Medžiagos davimo laikotarpiu kiekvieną dieną atidžiai stebima, ar gyvūnams pasireiškia toksiškumo požymiai. Bandymo metu nugaišusiems arba numarintiems gyvūnams atliekama nekroskopija, o pasibaigus bandymui tie, kurie išgyveno, numarinami ir taip pat atliekama jų nekroskopija.

Specifinis šio bandymų metodo tikslas yra nustatyti medžiagos neurologinį poveikį, todėl pabrėžiama gyvūnų atidus klinikinio stebėjimo siekiant gauti kuo daugiau informacijos svarba. Šiuo metodu nustatomi potencialiai neurotoksiški chemikalai, todėl gali reikėti išsamiau ištirti šį aspektą. Be to, šiuo metodu galima gauti duomenų apie medžiagos imunologinį poveikį ir toksiškumą dauginimosi organams.

**1.4. BANDYMO METODO APRAŠYMAS****1.4.1. Pasiruošimas**

Sveiki jauni suaugę gyvūnai atsitiktinės atrankos principu suskirstomi į kontrolinę ir bandomąsias grupes. Galimas narvų išdėstymo poveikis bandymo rezultatams turėtų būti minimalus. Kiekvienas gyvūnas individualiai pažymimas ir mažiausiai 5 dienas prieš bandymą laikomas narve, kad priprastų prie laboratorijos sąlygų.

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

Jeigu būtina, bandomoji medžiaga yra ištirpinama arba padaroma jos suspensija nešiklyje. Visų pirma rekomenduojamas vandeninis tirpalas arba suspensija, po jo pirmenybė teikiama aliejiniam tirpalui arba suspensijai (pvz., kukurūzų) ir tik po jų galimi kitų nešiklių tirpalai. Naudojamo kito nešiklio nei vanduo toksinės savybės turi būti žinomos. Turėtų būti nustatytas bandomosios medžiagos stabilumas nešiklyje.

**1.4.2. Bandymo sąlygos****1.4.2.1. Bandomieji gyvūnai**

Nors gali būti naudojamos ir kitos graužikų rūšys, pirmenybė teikiama žiurkėms. Naudojamos jaunų sveikų suaugusių gyvūnų įprastos laboratorinės veislės. Patelės turi būti neturėjusios palikuonių ir neapvaisintos. Medžiagos dozavimas prasideda tuoj po nujunkymo, bet kuriuo atveju ne vėliau nei gyvūnams sueina devynios savaitės.

Bandymo pradžioje gyvūnų kūno masės skirtumai turi būti minimalūs ir atitikti tos lyties kūno masės vidurkį  $\pm 20\%$ .

Jeigu prieš ilgalaikį bandymą atliekamas preliminarus kartotinių dozių per virškinamąjį traktą bandymą, abiejuose bandymuose naudojami gyvūnai turi būti tos pačios veislės ir būti iš to paties šaltinio.

#### 1.4.2.2. *Skaičius ir lytis*

Kiekvieno dydžio dozė duodama mažiausiai 10 gyvūnų (penkiems patinams ir penkioms patelėms). Jeigu numatoma, kad bandymo eigoje dalį gyvūnų teks numarinti, pradinis jų skaičius atitinkamai padidinamas.

Be to, papildomai 10 gyvūnų grupei (po penkis kiekvienos lyties gyvūnus) galima skirti didelę medžiagos dozę 28 dienas ir stebėti toksinio poveikio grįžtamumą, pastovumą ar uždelstumą. Tokiais atvejais naudojama ir papildoma 10 gyvūnų kontrolinė grupė (po penkis kiekvienos lyties gyvūnus).

#### 1.4.2.3. *Dozavimas*

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

Jeigu įvertinus turimus duomenis, nesitikima jokie 1 000 mg/kg kūno masės per dieną dozės poveikio, galima atlikti ribinį bandymą. Jeigu nėra tinkamų duomenų, padedančių nustatyti dozes, galima atlikti intervalo nustatymo bandymą.

Dozės dydžius reikia parinkti atsižvelgiant į jau turimus bandomosios ar jai giminingos medžiagos toksiškumo ir (toksiko-) kinetinius duomenis. Turi būti pasirenkama tokia didžiausia dozė, kuri sukeltų toksinį poveikį, tačiau nesukeltų gyvūno žūties ar didelių kančių. Kitos dozės turėtų būti parenkamos mažėjančia tvarka siekiant gauti ne tokias stiprias reakcijas, o mažiausia dozė turi nesukelti jokie pastebimo neigiamo poveikio (NOAEL). Dažniausiai optimali dozių mažėjimo seka yra tokia, kai jos yra du–keturis kartus viena už kitą mažesnės, ir geriau naudoti ketvirtą papildomą bandomąją grupę, negu kad tarp dozių būtų pernelyg dideli intervalai (pvz., faktorius didesnis negu 10).

Jei bandomosios medžiagos duodamos su pašarais ar geriamu vandeniu, jų kiekis turi nesutrikdyti normalaus gyvūnų maitinimosi ar vandens balanso. Kai bandomoji medžiaga duodama su pašarais, jos dozė gali būti išreikiama kaip pastovi pašarų koncentracija (ppm) arba kaip pastovus dozės lygis gyvūno kūno masės vienetui; kitus pasirinktus dozės išraiškos būdus reikėtų tiksliai apibrėžti. Zondu medžiagas reikėtų suleisti kasdien tuo pačiu laiku, be to, medžiagos dozė gali tekti pritaikyti prie gyvūno masės, kad jos dydis gyvūno masės vienetui išliktų tas pats.

Jeigu prieš ilgalaikį bandymą atliekamas preliminarus kartotinių dozių bandymas, abiejuose bandymuose gyvūnams turi būti duodami panašūs pašarai.

#### 1.4.2.4. *Ribinis bandymas*

Jeigu skiriant vieną ne mažesnę kaip 1 000 mg/kg kūno masės per dieną dozę ar, jei medžiaga duodama su pašarais ar geriamu vandeniu, atitinkamą jos procentą pašaruose ar geriamame vandenyje (kuris nustatomas pagal gyvūno kūno masę), nepastebima toksinio poveikio ir jeigu sprendžiant iš turimų duomenų apie struktūriškai panašias medžiagas toksiškumas nenumatomas, tuomet viso bandymo su trimis dozėmis atlikti nebūtina. Ribinis bandymas netaikomas, kai, atsižvelgiant į žmogaus sąlytį su medžiaga, reikia išbandyti didesnes dozes.

#### 1.4.2.5. *Stebėjimo laikotarpis*

Stebėjimo laikotarpis turėtų trukti 28 dienas. Papildoma gyvūnų grupė, skirta tolesniam stebėjimui, laikoma ne duodant jokių medžiagų dar mažiausiai 14 dienų, siekiant nustatyti vėliau pasireiškiantį poveikį, poveikio tęstinumą ir atsigavimą po poveikio.

#### 1.4.3. **Bandymo eiga**

Gyvūnams bandomoji medžiaga duodama 28 dienas kasdien septynias dienas per savaitę; jeigu laikomasi penkių dienų per savaitę režimo, tai reikia pagrįsti. Vienkartinė bandomosios medžiagos dozė suleidžiama zondu, naudojant skrandžio vamzdelį ar tinkamą intubavimo (įleidimo) kaniulę. Maksimalus vienkartinis suleidžiamo skysčio tūris priklauso nuo bandomojo gyvūno dydžio. Bandomosios medžiagos tirpalo tūris neturi viršyti 1 ml/100 g kūno masės, tačiau naudojant vandeninį bandomosios medžiagos tirpalą galima suleisti 2 ml/100 g kūno masės. Dirginamųjų ir ardančiųjų medžiagų, kurių didelės koncentracijos sukelia sunkius poveikius, tūrio svyravimai turi būti kuo mažesni: koncentracija pakoreguojama taip, kad visų dozių tūris būtų toks pats.

#### 1.4.3.1. Bendri stebėjimai

Bendrus klinikinius stebėjimus reikia atlikti mažiausiai kartą per dieną, geriausiai tuo pačiu dienos metu, atsižvelgiant į numatomų poveikių piką. Gyvūnų sveikatos būklę reikia registruoti. Mažiausiai du kartus per dieną visi gyvūnai turėtų būti patikrinami – ar negaišta, ar nenugaišę. Kai tik pastebimi, gaištantys ar patiriantys dideles kančias ir skausmą gyvūnai turi būti iškeliami iš narvų, humaniškai numarinami ir atliekama jų nekroskopija.

Prieš viso bandymo pradžią atliekami išsamūs visų gyvūnų klinikiniai stebėjimai (individų palyginimui), o vėliau – mažiausiai kartą per savaitę. Kiekvieną kartą šie stebėjimai atliekami tuo pačiu metu, perkėlus gyvūną iš narvo į tam skirtą vietą. Stebėjimai yra kruopščiai registruojami (geriausia tai daryti taikant balų sistemą, specialiai tam nustatytą bandymų laboratorijos). Reikia stengtis, kad bandymo sąlygos kistų kuo mažiau, o stebėtojai neturėtų žinoti, koks bandymas atliekamas su gyvūnais. Stebėjimas turi apimti odos, kailio, akių, gleivinės pakitimų, išskyrų, išmatų, autonominio aktyvumo (pvz., ašarojimo, plaukų pašaušimo, vyzdžio dydžio, neįprasto kvėpavimo) registravimą, bet neturi tuo apsiriboti. Reikėtų registruoti eisenos, pozos, reakcijos į paėmimą rankomis pakitimus, kloninių ar toninių judesių atsiradimą bei stereotipinį (pvz., besaikį valymąsi, pasikartojantį sukimąsi ratu) ar keistą (pvz., savęs luošinimą, vaikščiojimą atbulomis) elgesį.

Ketvirtą poveikio savaitę turėtų būti įvertintas juntamasis reaktyvumas į skirtingų tipų stimulą (pvz., klausos, regėjimo ir proprioceptorinį), jėgos (spaudimo) stiprumas bei judamasis aktyvumas. Papildomos informacijos apie galimas procedūras pateikta literatūroje (žr. Bendrojo įvado B dalį).

Funkciniai stebėjimai ketvirtą savaitę gali būti neatliekami, jei bandymas yra preliminarus kartotinių dozių bandymas, atliekamas prieš pusiau lėtinio poveikio (90 dienų) bandymą. Tokiu atveju šie stebėjimai atliekami pusiau lėtinio poveikio bandymo metu. Kita vertus, tokie funkciniai stebėjimai kartotinių dozių bandyme padidina galimybę geriau parinkti dozių dydžius tolesniam pusiau lėtinio poveikio bandymui.

Išimtiniais atvejais funkciniai stebėjimai neatliekami ir tose grupėse, kuriose nustatomi tokio masto toksiškumo požymiai, kurie labai trukdytų atlikti funkcinius tyrimus.

#### 1.4.3.2. Kūno masė ir maisto bei vandens suvartojimas

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

#### 1.4.3.3. Hematologija

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

Kraujo pavyzdžius reikėtų paimti iš nurodytų vietų dar prieš gyvūnų numarinimą arba jo metu ir saugoti atitinkamomis sąlygomis.

#### 1.4.3.4. Klinikinė biochemija

Siekiant ištirti pagrindinius toksinius poveikius audiniams, ypač inkstams ir kepenims, dar prieš gyvūnų numarinimą arba jo metu (neskaitant gaištančių gyvūnų ar numarintų bandymo metu) reikėtų atlikti kraujo klinikinius biocheminius tyrimus. Rekomenduojama gyvūnų nešerti iš vakaro prieš kraujo paėmimą<sup>(1)</sup>. Kraujo plazmoje arba serume tiriama: natrijs, 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.

<sup>(1)</sup> 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 bandomosios medžiagos poveikį. Klinikiniai biocheminiai tyrimai turi būti atliekami tik ketvirtą tyrimų savaitę atlikus funkcinius stebėjimus.

Paskutinę bandymo savaitę taip pat galima atlikti šlapimo tyrimus, surinkus šlapimą nustatytu metu; tiriama: šlapimo tūris, išvaizda, kvapas, lyginamasis svoris, pH, baltymai, gliukozė ir kraujo ląstelės.

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

Apskritai turi būti laikomasi lankstaus principo ir atsižvelgiama į naudojamų gyvūnų rūšį, pastebėtą ir (ar) numatomą konkrečios bandomos medžiagos poveikį.

Jeigu turimi duomenys apie medžiagą yra netinkami, reikia apsvarstyti galimybę nustatyti hematologinius ir klinikinius biocheminius kintamuosius dar prieš dozavimo pradžią.

#### 1.4.3.5. *Bendrasis skrodimas*

Kiekvienas bandomasis gyvūnas turi būti skrodžiamas, atidžiai ištiriamas jo kūno paviršius bei visos jo angos, kaukolė, krūtinės lašta, pilvo ertmės bei jų turinys. Visų gyvūnų kepenys, inkstai, antinksčiai, sėklidės, antsklidis, užkrūčio liauka, blužnis, smegenys bei širdis turi būti nuvalyti nuo priglundusių pašalinių audinių ir pasverti kuo greičiau po nekroskopijos, kol nepradėjo džiūti.

Audinius reikia konservuoti geriausiai jiems tinkamoje fiksavimo terpėje. Histopatologiškai reikėtų ištirti visus bendruosius pakenkimus, smegenis (jų būdingiausias dalis – didžiausias smegenis, smegenėles ir smegenų tiltą), nugaros smegenis, skrandį, mažąsias ir didžiąsias žarnas (taip pat Peyerio plokšteles), kepenis, inkstus, antinksčius, blužnį, širdį, užkrūčio liauką, skydliaukę, trachėją ir plaučius (pripūciant 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 toliau, turėtų atspindėti somatinius poveikius), esantį arčiau raumens periferinį nervą (sėdimąjį arba blauzdikaulio) bei kaulų čiulpų dalį (arba šviežiai paruoštą kaulų čiulpų punkciją). Gavus klinikinių ir kitų tyrimų duomenis gali paaiškėti, kad reikia ištirti papildomus audinius. Be to, turėtų būti konservuojami visi organai, kuriuos, atsižvelgiant į žinomas bandomosios medžiagos savybes, ji galėtų paveikti.

#### 1.4.3.6. *Histopatologinis ištyrimas*

Visų kontrolinės ir didžiausios dozės grupių gyvūnų organus ir audinius reikia visiškai histopatologiškai ištirti. Jeigu didžiausią dozę gavusiems gyvūnams medžiaga sukėlė pakitimų, histopatologiškai ištirti galima ir kitų grupių gyvūnus.

Visus stambius pakenkimus reikia ištirti.

Jei naudojama papildoma gyvūnų grupė, histopatologiškai reikia ištirti tuos šių gyvūnų audinius ir organus, kuriuose pastebėta pakitimų bandomųjų gyvūnų atveju.

## 2. **DUOMENYS**

Turėtų būti pateikiami kiekvieno gyvūno duomenys. Be to, visi duomenys turėtų būti apibendrinti lentelėse, pateikiant kiekvienos bandomosios grupės gyvūnų skaičių bandymo pradžioje, bandymo metu nugaišusių gyvūnų arba bandymo metu humaniško sumetimais numarintų gyvūnų skaičių ir kiekvieno nugaišimo ar numarino laiką, gyvūnų su toksiškumo požymiais skaičių, pastebėtų toksiškumo požymių apibūdinimą, įskaitant jų pasireiškimo pradžią, trukmę ir sunkumo laipsnį, gyvūnų su pakenkimais skaičių, pakenkimų tipą ir gyvūnų su kiekvieno tipo pakenkimais procentą.

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

### 3. ATASKAITOS PATEIKIMAS

#### BANDYMO ATASKAITA

Bandymo ataskaitoje, jei įmanoma, turėtų būti ši informacija:

##### *Bandomieji gyvūnai:*

- naudotos rūšys ir veislės,
- gyvūnų skaičius, amžius ir lytis,
- gavimo šaltinis, laikymo sąlygos, pašarai ir kt.,
- kiekvieno gyvūno kūno masė bandymo pradžioje, kiekvieną savaitę ir bandymo pabaigoje.

##### *Bandymo sąlygos:*

- pagrindimas, jeigu nešikliu pasirinktas ne vanduo,
- dozių parinkimo paaiškinimas,
- informacija apie bandomosios medžiagos mišinio su pašarais paruošimą, preparato gauta koncentracija, stabilumas ir homogeniškumas,
- išsami informacija apie bandomosios medžiagos davimo būdą,
- perskaičiavimas bandomosios medžiagos koncentracijos maiste/vandenyje (ppm) į faktinę dozę (mg/kg kūno masės/d), jeigu taikoma,
- maisto ir vandens kokybė.

##### *Rezultatai:*

- kūno masė ir kūno masės pokyčiai,
- maisto ir vandens suvartojimas, jeigu taikoma,
- duomenys apie toksišią poveikį, įskaitant toksiškumo požymius pagal lytį ir dozės dydį,
- pastebėtų klinikinių poveikių tipas, sunkumo laipsnis ir trukmė (kurie grįžtami, kurie ne),
- juntamojo aktyvumo, spaudimo (jėgos) stiprumo ir judamojo aktyvumo įvertinimas,
- hematologiniai tyrimai su atitinkamomis palyginamosiomis reikšmėmis;
- klinikiniai biocheminiai tyrimai su atitinkamomis palyginamosiomis reikšmėmis,
- kūno masė numarinimo metu bei organų masė,
- nekroskopijos duomenys,
- išsamus visų histopatologinių duomenų aprašymas,

- absorbcijos duomenys, jeigu yra,
- statistinis rezultatų apdorojimas, jei atliktas.

*Rezultatų aptarimas.*

*Išvados.*

#### 4. **NUORODOS**

Šis metodas atitinka OECD TG 407.

**B.8. KARTOTINIŲ DOZIŲ (28 DIENŲ) TOKSIŠKUMAS (PER KVĖPAVIMO TAKUS)****1. METODAS****1.1. ĮVADAS**

Naudinga turėti išankstinės informacijos apie medžiagos dalelių dydžio pasiskirstymą, garų slėgį, lydymosi temperatūrą, virimo temperatūrą, pliūpsnio temperatūrą ir sprogamumą (atitinkamais atvejais).

Taip pat žr. Bendrojo įvado B dalies A skirsnį.

**1.2. APIBRĖŽTYS**

Žr. Bendrojo įvado B dalies B skirsnį.

**1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS**

Nėra.

**1.4. BANDYMO METODO PRINCIPAS**

Kelios eksperimentinių gyvūnų grupės 28 dienas kiekvieną dieną nustatytą laikotarpį veikiamos nuosekliai parinktos koncentracijos bandomąja medžiaga, vienai grupei naudojama ta pati koncentracija. Jeigu nešiklis naudojamas tam, kad būtų lengviau gaunama atitinkama bandomosios medžiagos koncentracija atmosferoje, turėtų būti naudojama kontrolinė nešiklio grupė. Veikimo medžiaga laikotarpiu gyvūnai stebimi kiekvieną dieną siekiant nustatyti toksiškumo požymius. Gyvūnams, kurie nugaišta bandymo metu, atliekama nekroskopija, o užbaigus bandymą nekroskopija atliekama jį išgyvenusiems gyvūnams.

**1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI**

Nėra.

**1.6. BANDYMO METODO APIBŪDINIMAS****1.6.1. Pasirengimas**

Gyvūnai laikomi eksperimentinėmis laikymo ir šėrimo sąlygomis ne trumpiau kaip penkis dienas iki eksperimento pradžios. Prieš bandymą sveiki jauni gyvūnai atrenkami „aklos atrinkties“ metodu ir suskirstomi į reikalingą skaičių grupių. Tam tikrais atvejais į bandomąją medžiagą gali būti dedama atitinkamo nešiklio, kad būtų lengviau gaunama atitinkama medžiagos koncentracija atmosferoje. Jeigu nešiklis arba kiti priedai naudojami dozavimui palengvinti, turi būti žinoma, kad jie nesukelia toksinio poveikio. Atitinkamais atvejais gali būti naudojami ankstesnių bandymų duomenys.

**1.6.2. Bandymo sąlygos****1.6.2.1. Bandomieji gyvūnai**

Jeigu nėra kontraindikacijų, pirmenybė teikiama žiurkėms. Naudojami įprastų laboratorinių veislių jauni, sveiki gyvūnai.

Bandymo pradžioje gyvūnų svorio pokyčiai neturėtų viršyti  $\pm 20\%$  atitinkamo vidutinio svorio.

**1.6.2.2. Skaičius ir lytis**

Kiekvienoje bandymo grupėje turėtų būti naudojama ne mažiau kaip 10 gyvūnų (penkios patelės ir penki patinėliai). Patelės turėtų būti neturėjusios palikuonių ir neapvaisintos. Jeigu numatoma, kad bandymo eigoje dalį gyvūnų teks numarinti, pradinis jų skaičius atitinkamai padidinamas. Be to, papildomai 10 gyvūnų grupei (po penkis kiekvienos lyties gyvūnus) galima skirti po didelę medžiagos dozę 28 dienas ir stebėti toksinio poveikio grįžtamumą, pastovumą ar uždelstumą 14 dienų po paskutinę dozę davimo. Tokiais atvejais naudojama ir papildoma 10 gyvūnų kontrolinė grupė (po penkis kiekvienos lyties gyvūnus).

#### 1.6.2.3. Dozavimas

Turi būti išbandytos trys bandomosios medžiagos koncentracijos ir turi būti viena kontrolinė arba nešiklio kontrolinė grupė (gaunanti didžiausios koncentracijos nešiklį), jeigu naudojamas nešiklis. Su kontrolinės grupės gyvūnais reikia elgtis lygiai taip pat kaip ir su bandomaisiais gyvūnais, išskyrus tai, kad jie negauna bandomosios medžiagos. Didžiausia koncentracija turėtų būti tokia, kad sukeltų toksinį poveikį, bet nesukeltų gyvūnų žūties (arba tik nedidelį gaištamumą). Mažiausia koncentracija turėtų būti tokia, kad nebūtų pastebėta jokių toksiškumo požymių. Jeigu yra tinkamas poveikio žmogui įvertinimas, mažiausia koncentracija turėtų būti šiek tiek didesnė už poveikio žmogui koncentraciją. Būtų geriausia, jeigu tarpinė koncentracija būtų tokia, kad sukeltų mažiausią pastebimą toksinį poveikį. Jeigu naudojama daugiau tarpinių koncentracijų, jos turėtų būti išskirtomos intervalais taip, kad toksinis poveikis būtų laipsniškas. Mažų ir tarpinių dozių bei kontrolinėje grupėje gaištamumas turėtų būti nedidelis, kad būtų galima prasmingai įvertinti rezultatus.

#### 1.6.2.4. Veikimo trukmė

Kiekvieną dieną veikimo trukmė turėtų būti šešios valandos, bet gali būti reikalinga kitokia trukmė, kad atitiktų specialius reikalavimus.

#### 1.6.2.5. Įranga

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 veikiamoji atmosfera. Jeigu naudojama kamera, ji turėtų būti tokios konstrukcijos, kad gyvūnai kuo mažiau susigrūstų ir kad jie įkvėptų kuo daugiau bandomosios medžiagos. Paprastai, norint užtikrinti kameros atmosferos pastovumą, visas bandomų gyvūnų „tūris“ neturėtų viršyti 5 % bandomo kameros tūrio. Atskirose kameroje gali būti paveikiama burna ir nosis, tik galva arba visas kūnas; du pirmieji būdai padeda sumažinti bandomosios medžiagos patekimą kitais keliais.

#### 1.6.2.6. Stebėjimo laikotarpis

Visą veikimo medžiaga laikotarpį ir sveikimo laikotarpį kiekvieną dieną eksperimentiniai gyvūnai stebimi, ar jiems pasireiškia, toksiškumo požymiai. Nugaišimo laikas ir tas laikas, kai pasireiškia ir išnyksta toksiškumo požymiai, turėtų būti registruojamas.

#### 1.6.3. Bandomo eiga

Gyvūnai 28 dienų laikotarpiu nuo penkių iki septynių dienų per savaitę kiekvieną dieną yra veikiami bandomąja medžiaga. Gyvūnai, esantys bet kurioje papildomoje grupėje, kuri toliau stebima, turėtų būti laikomi dar 14 dienų neveikiami medžiaga, kad būtų galima nustatyti, ar jie atsigauja po toksinio poveikio, ar poveikis nepraeina. Bandomo patalpoje turėtų būti palaikoma  $22 \pm 3$  °C temperatūra.

Tinkamiausias santykinis oro 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 ( $\leq 5$  mm vandens), bandomoji medžiaga negalės patekti į aplinką. Veikimo 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 veikimo kameroje būtų užtikrinamos vienodos sąlygos. Tokia sistema turėtų užtikrinta, kad kaip galima greičiau būtų sukuriamos pastovios veikimo sąlygos.

Turėtų būti matuojama arba reguliuojama:

- a) oro srauto greitis (nenutrūkstamai);
- b) tikroji bandomosios medžiagos koncentracija, matuojama kvėpavimo zonoje. Kasdieninio veikimo laikotarpiu koncentracija neturėtų svyruoti daugiau negu  $\pm 15$  % vidutinės vertės. Tačiau tam tikrų aerozolių atveju šio kontrolės lygio neįmanoma pasiekti, tada priimtinas platesnis intervalas. Viso bandymo metu kiekvienos dienos koncentracijos turėtų būti, kiek tai praktiškai įmanoma, išlaikomos pastovios. Kartą per savaitę turėtų būti atliekama bent viena kiekvienos bandomosios grupės aerozolių dalelių dydžio analizė;
- c) temperatūra ir drėgnumas, jeigu įmanoma nenutrūkstamai.



Veikimo metu ir po jo vykdomi nuolatiniai stebėjimai ir registravimas; apie kiekvieną gyvūną 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, somatomotorinio aktyvumo ir elgsenos sutrikimai. Kiekvieną savaitę turėtų būti nustatomas gyvūnų svoris. Taip pat rekomenduojama kiekvieną savaitę matuoti suvartoto pašaro kiekį. Reguliarus gyvūnų stebėjimas yra reikalingas tam, kad būtų užtikrinama, jog kiek įmanoma bus stengiamasi bandymo metu neprarasti gyvūnų dėl tokių priežasčių kaip kanibalizmas, audinių autolizė arba netinkama laikymo vieta. Bandymo laikotarpio pabaigoje išlikusiems nepagalbinės grupės gyvūnams atliekama nekroskopija. Gaištantys gyvūnai ir gyvūnai, kenčiantys dideles kančias ar skausmą, kai tik pastebima, turėtų būti pašalinami, humaniškai numarinami ir atliekama jų nekroskopija.

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;
- 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.

Siekiant išsamiau ištirti pastebėtą toksiinį poveikį, atitinkamais atvejais gali būti naudojami papildomi klinikiniai biocheminiai tyrimai.

#### 1.6.3.1. Bendroji nekroskopija

Visiems bandomieji gyvūnams turi būti atliekama visa bendroji nekroskopija. Bent jau kepenys, inkstai, antinksčiai, plaučiai ir sėklidės turėtų būti pasveriami drėgni tuojau pat po nekroskopijos, 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

Turėtų būti atliekamas didelių koncentracijų grupės ir kontrolinės grupės gyvūnų užkonservuotų organų ir audinių histologinis ištyrimas. Bandomosios medžiagos pažeisti didžiausios koncentracijos grupės gyvūnų organai ir audiniai turėtų būti ištiriami visose mažesnių dozių grupėse. Visi papildomos grupės gyvūnai turėtų būti ištiriami histologiškai, ypačingą dėmesį skiriant tiems organams ir audiniams, kurie buvo paveikti bandomųjų gyvūnų atveju.

## 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, šaltinis, aplinkos sąlygos, pašaras ir pan.,

— bandymo sąlygos.

Veikimo aparato apibūdinimas bei brėžinys, tipas, matmenys, taip pat oro šaltinis, aerozolių generavimo sistema, oro kondicionavimo metodas, išmetamo oro apdorojimo būdas 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 bandomos medžiagos kiekis, patekęs į inhaliacijos įrenginį, padalytas iš oro tūrio);
- d) nešiklio rūšis, jeigu naudotas;
- e) faktinės koncentracijos bandymo kvėpavimo zonoje;
- f) masės medianinis aerodinaminis skersmuo (MMAD) ir geometrinis standartinis nuokrypis (GSD);

— duomenys apie toksiinę reakciją pagal lytį ir koncentraciją,

— nugaišimo laikas bandymo metu arba nurodoma, kad gyvūnai išgyveno iki pabaigos,

— toksiškų arba kitokių poveikių apibūdinimas; poveikio nesukeliančios koncentracijos lygis,

— kiekvieno ypatingo požymio stebėjimo laikas ir tolesnė jo eiga,

— duomenys apie maistą ir kūno svorį,

— naudoti hematologiniai tyrimai ir jų rezultatai,

— naudoti klinikiniai biocheminiai tyrimai ir jų rezultatai,

— nekroskopijos duomenys,

— išsamus visų histopatologinių duomenų aprašymas,

— statistinis duomenų apdorojimas, jeigu įmanomas,

— duomenų aptarimas,

— duomenų aiškinimas.

3.2. DUOMENŲ ĮVERTINIMAS IR AIŠKINIMAS

Žr. Bendrojo įvado B dalies D skirsnį.

4. **NUORODOS**

Žr. Bendrojo įvado B dalies E skirsnį.

B.9. **KARTOTINIŲ DOZIŲ (28 DIENŲ) TOKSIŠKUMAS (PER ODA)**1. **METODAS**

## 1.1. ĮVADAS

Žr. Bendrojo įvado B dalies A skirsnį.

## 1.2. APIBRĖŽTYS

Žr. Bendrojo įvado B dalies B skirsnį.

## 1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Nėra.

## 1.4. BANDYMO METODO PRINCIPAS

Bandomoji medžiaga 28 dienas kiekvieną dieną dedama ant odos fiksuoto dydžio dozėmis kelioms eksperimentinių gyvūnų grupėms, viena dozė – vienai grupei. Veikimo laikotarpiu gyvūnai stebimi kiekvieną dieną toksiškumo požymiams nustatyti. Gyvūnams, kurie nugaišta bandymo metu, atliekama nekroskopija, bandymą užbaigus išlikusiems gyvūnams taip pat atliekama nekroskopija.

## 1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

Nėra.

## 1.6. BANDYMO METODO APIBŪDINIMAS

1.6.1. **Pasirengimas**

Gyvūnai laikomi eksperimentinėmis laikymo ir šėrimo sąlygomis ne trumpiau kaip penkias dienas iki eksperimento pradžios. Prieš bandymą sveiki jauni gyvūnai atrenkami „aklos atrinktųjų“ metodu ir paskiriami į poveikio ir kontrolines grupes. Prieš pat bandymą nuo bandomųjų gyvūnų kūno sprando srityje nukerpamas kailis. Galima ir skusti, bet tai turėtų būti atliekama apytikriai prieš 24 valandas iki bandymo. Pakartotinai kirpti arba skusti paprastai reikia apytikriai kas savaitę. Jeigu kailis kerpamas arba skutamas, reikia stengtis nesubraižyti odos. Bandomajai medžiagai uždėti turėtų būti nukerpama ne mažiau kaip 10 % kūno paviršiaus. Sprendžiant, nuo kokio dydžio ploto pašalinti kailį, turėtų būti atsižvelgiama į gyvūno kūno svorį, ir į apdangalo dydį. Jeigu bandomos kietosios medžiagos, kurios prirėkus gali būti susmulkinamos į miltelius, bandomoji medžiaga turėtų būti pakankamai sudrėkinama vandeniu arba, tam tikrais atvejais, atitinkamu nešikliu, kad būtų užtikrintas geras sąlytis su oda. Skystos bandomosios medžiagos paprastai naudojamos neskiestos. Medžiaga dedama ant odos nuo penkių iki septynių kartų per savaitę.

1.6.2. **Bandymo sąlygos**1.6.2.1. *Bandomieji gyvūnai*

Gali būti naudojamos suaugusios žiurkės, triušiai arba jūrų kiaulytės. Gali būti naudojamos kitos rūšys, bet jų naudojimas turėtų būti pagrindžiamas.

Bandymo pradžioje naudojamų gyvūnų svorio intervalas turėtų būti ne daugiau kaip  $\pm 20\%$  atitinkamo vidutinio svorio.

1.6.2.2. *Skaičius ir lytis*

Kiekvieno dydžio dozė bandoma su ne mažiau 10 gyvūnų (penkios patelės ir penki patinėliai), turinčių sveiką odą. Patelės turėtų būti neturėjusios palikuonių ir neapvaisintos. Jeigu numatoma, kad bandymo eigoje dalį gyvūnų teks numarinti, pradinis jų skaičius atitinkamai padidinamas. Be to, papildomai 10 gyvūnų grupei (po penkis kiekvienos lyties gyvūnus) galima skirti didelę medžiagos dozę 28 dienas ir 14 dienų po veikimo medžiaga stebėti toksinio poveikio grįžtamumą, pastovumą ar uždelstumą. Taip pat naudojama papildoma 10 kontrolinių gyvūnų grupė (po penkis kiekvienos lyties gyvūnus).

### 1.6.2.3. *Dozavimas*

Reikalingos ne mažiau kaip trys dozės, kontrolinė grupė arba nešiklio kontrolinė grupė, jeigu naudojamas nešiklis. Veikimo laikas turėtų būti ne trumpesnis kaip šešios valandos per dieną. Bandomoji medžiaga turėtų būti uždedama panašiu laiku kiekvieną dieną ir tam tikrais intervalais (kas savaitę arba kas dvi savaites) suderinami taip, kad gyvūno kūno svorio atžvilgiu būtų išlaikoma pastovi dozė. Su kontrolinės grupės gyvūnais reikia elgtis lygiai taip pat kaip ir su bandomaisiais gyvūnais, išskyrus tai, kad jie negauna bandomosios medžiagos. Didžiausia dozė turėtų būti tokia, kad sukeltų toksinį poveikį, bet nesukeltų gyvūnų žūties (arba tik nedidelį gaištumą). Mažiausia dozė turėtų būti tokia, kad nebūtų pastebėta jokių toksiškumo požymių. Jeigu yra tinkamas poveikio žmogui įvertinimas, mažiausia dozė turėtų būti šiek tiek didesnė už poveikio žmogui dozę. Būtų geriausia, jeigu vidurinė dozė būtų tokia, kad sukeltų mažiausią pastebimą toksinį poveikį. Jeigu naudojama daugiau tarpinių dozių, jos turėtų būti išskirstomos intervalais taip, kad toksinis poveikis būtų laipsniškas. Mažų ir tarpinių dozių bei kontrolinėje grupėse gaištumas turėtų būti nedidelis, kad būtų galima prasmingai įvertinti rezultatus.

Jeigu uždėta bandomoji medžiaga sukelia stiprų odos dirginimą, koncentracijos turėtų būti sumažinamos, ir dėl to gali susilpnėti kitas toksinis poveikis ar jo iš viso gali nebūti gavus didelę medžiagos dozę. Be to, jeigu oda labai stipriai pažeidžiama, bandymą gali reikėti nutraukti ir pradėti naują bandymą naudojant mažesnės koncentracijos dozes.

### 1.6.2.4. *Ribinis bandymas*

Jeigu preliminarus bandymas naudojant 1 000 mg/kg dozę arba didesnę dozę, susijusią su tikėtiniu poveikiu žmogui, jeigu toks žinomas, nesukelia aiškaus toksinio poveikio, bandymo galima nebetęsti.

### 1.6.2.5. *Stebėjimo laikotarpis*

Bandomieji gyvūnai turėtų būti stebimi kiekvieną dieną, siekiant nustatyti toksiškumo požymius. Turėtų būti registruojamas nugaishimo laikas ir laikas, kada atsirado ir išnyko toksiškumo požymiai.

### 1.6.3. **Bandymo eiga**

Gyvūnai turėtų būti laikomi atskiruose narveliuose. Gyvūnai veikiami bandomąja medžiaga 28 dienas, geriausiai septynias dienas per savaitę. Gyvūnai, esantys papildomoje grupėje, skirtoje toliau stebėti, turėtų būti laikomi dar 14 dienų jiems neduodant bandomosios medžiagos, kad būtų galima nustatyti atsigavimą po toksinio poveikio arba tokio poveikio užsitęsimą. Veikimo bandomąja medžiaga trukmė turi būti ne trumpesnė kaip šešios valandos per dieną.

Bandomoji medžiaga turėtų būti tolygiai uždedama ant plotelio, kurio dydis sudaro apie 10 % viso kūno paviršiaus. Jeigu medžiagos labai toksiškos, veikiamas paviršius gali būti mažesnis, bet kaip galima didesnis plotas turėtų būti padengiamas kuo plonesniu ir tolygesniu sluoksniu.

Veikimo laikotarpiu bandomoji medžiaga turėtų būti laikoma ant odos aktyvu marlės tvarščiu ir nedirginančia lipnia juoste. Bandomoji vieta apdengiama papildomai, kad laikytųsi marlės tvarstis su bandomąja medžiaga, ir būtų užtikrinama, kad gyvūnai nepraris bandomosios medžiagos. Gali būti naudojami ribotuvai, kad bandomoji medžiaga nebūtų praryjama, bet visiško imobilizavimo metodas nerekomenduojamas. Gali būti taikomas ir „apsauginio antkaklio“ metodas.

Pasibaigus veikimo laikotarpiui, bandomosios medžiagos likutis turėtų būti pašalinamas, jeigu tinka – naudojant vandenį ar kokią kitą tinkamą odos valymo būdą.

Visi gyvūnai turėtų būti stebimi kiekvieną dieną, o toksiškumo požymiai registruojami nurodant jų pasireiškimo laiką, laipsnį ir trukmę. Turėtų būti stebimi odos ir kailio, akių ir akies gleivinės pokyčiai, taip pat kvėpavimo, kraujo apytakos, vegetacinės ir centrinės nervų sistemų pokyčiai, somatomotorinio aktyvumo ir elgsenos sutrikimai. Kiekvieną savaitę turėtų būti nustatomas gyvūnų svoris. Taip pat rekomenduojama kiekvieną savaitę matuoti suvartoto pašaro kiekį. Reguliarus gyvūnų stebėjimas yra reikalingas tam, kad būtų užtikrinama, jog bandomieji gyvūnai nebus prarasti dėl tokių priežasčių kaip kanibalizmas, audinių autolizė arba narvo pastatymas netinkamoje vietoje. Bandymo laikotarpio pabaigoje išlikusiems ne pagalbinės grupės gyvūnams atliekama nekroskopija. Gaištantys gyvūnai ir gyvūnai, kenčiantys dideles kančias ar skausmą, kai tik pastebima, turėtų būti pašalinami iš bandymo, humaniškai numarinami ir atliekama jų nekroskopija.

Bandymo pabaigoje visiems gyvūnams, taip pat ir kontroliniams, atliekami tokie tyrimai:

- 1) hematologija, taip pat bent jau kraujo kūnelių, hemoglobino koncentracijos, eritrocitų kiekio apskaičiavimas, visas ir diferencinis leukocitų kiekis ir krešėjimo matavimas;

- 2) klinikinė kraujo biochemija, įskaitant ne mažiau kaip vieną kepenų ir inkstų funkcijų 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, metemoglobino, cholinesterazės aktyvumo analizė.

Atitinkamais atvejais gali būti atliekami papildomi klinikinės biochemijos tyrimai siekiant išsamiau iširti pastebėtą toksinį poveikį.

#### 1.6.4. **Bendroji nekroskopija**

Visiems bandomiesiems gyvūnams turėtų būti atliekama visa bendroji nekroskopija. Bent jau kepenys, inkstai, antinksčiai ir sėklidės turėtų būti pasveriami drėgni tuojau pat po nekroskopijos, kad neišdžiūtų. Organai ir audiniai (tai yra tie organai, kurie turi didelių matomų pakenkimų arba kurių dydis pakitęs) turėtų būti konservuojami atitinkamoje terpėje galimam histopatologiniam ištyrimui ateityje.

#### 1.6.5. **Histopatologinis ištyrimas**

Turėtų būti atliekamas didelės dozės grupės ir kontrolinės grupės gyvūnų užkonservuotų organų ir audinių histologinis ištyrimas. Bandomosios medžiagos pažeisti didžiausios koncentracijos grupės gyvūnų organai ir audiniai turėtų būti ištiriami visose mažesnių dozių grupėse. Visi papildomos grupės gyvūnai turėtų būti ištiriami histologiškai, ypačingą dėmesį skiriant tiems organams ir audiniams, kurie buvo paveikti bandomųjų gyvūnų atveju.

## 2. **DUOMENYS**

Duomenys turėtų būti apibendrinami lentelėse, nurodant kiekvienos bandomosios grupės gyvūnų skaičių bandymo pradžioje ir gyvūnų, kuriems pasireiškė kiekvienos rūšies pakenkimai, skaičių.

Visi stebėti rezultatai turi būti įvertinami naudojant atitinkamą statistikos metodą. Gali būti naudojamas bet kuris pripažintas statistikos metodas.

## 3. **ATASKAITOS PATEIKIMAS**

### 3.1. **BANDYMO ATASKAITA**

Bandymo ataskaitoje, jeigu įmanoma, pateikiama tokia informacija:

- duomenys apie gyvūnus (rūšis, veislė, šaltinis, aplinkos sąlygos, pašaras ir pan.),
- bandymo sąlygos (taip pat tvarstymo būdas: nepralaidus ar pralaidus),
- dozės (nurodant nešiklį, jeigu naudotas) ir koncentracijos,
- poveikio nesukelianti dozė, jeigu įmanoma,
- duomenys apie toksines reakcijas pagal lytį ir dozę,
- nugaišimo laikas bandymo metu arba nurodant, ar gyvūnas išgyveno iki pabaigos,
- toksinis arba kitoks poveikis,
- visų nenormalių požymių pastebėjimo laikas ir tolesnė eiga,

- duomenys apie pašarą ir kūno svorį,
- naudoti hematologiniai tyrimai ir jų rezultatai,
- naudoti klinikiniai biocheminiai tyrimai ir jų rezultatai,
- nekroskopijos duomenys,
- išsamus visų histopatologinių duomenų aprašymas,
- statistinis duomenų apdorojimas, jeigu įmanomas,
- duomenų aptarimas,
- duomenų aiškinimas.

3.2. DUOMENŲ ĮVERTINIMAS IR AIŠKINIMAS

Žr. Bendrojo įvado B dalies D skirsnį.

4. **NUORODOS**

Žr. Bendrojo įvado B dalies E skirsnį.

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

## 1. METODAS

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

## 1.1. ĮVADAS

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

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

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

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

Taip pat žr. Bendrojo įvado B dalį.

## 1.2. APIBRĖŽTYS

**Chromatidinė aberacija** – struktūrinis chromosomos pakenkimas, pasireiškiantis kaip pavienių chromatidžių suardymas arba kaip chromatidžių suardymas ir susijungimas.

**Chromotidinė aberacija** – struktūrinis chromosomos pakenkimas, pasireiškiantis kaip abiejų seserinių chromatidžių trūkis arba kaip jų abiejų trūkis ir susijungimas toje pačioje vietoje.

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

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

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

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

**Poliploidiškas** – haploidinio chromosomų skaičiaus (n), išskyrus diploidinį skaičių (t. y. 3n, 4n ir t. t.), kartotinis.

**Struktūrinė aberacija** – chromosomos struktūros pokytis, kurį galima nustatyti dalijimosi ciklo metafazėje esančias ląsteles tiriant mikroskopu; jis pasireiškia kaip delecijos ir fragmentai, pokyčiai grandinių viduje ar tarp grandinių.



### 1.3. BANDYMO METODO PRINCIPAS

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

### 1.4. BANDYMO METODO APIBŪDINIMAS

#### 1.4.1. Preparatai

##### 1.4.1.1. Ląstelės

Galima naudoti įvairiausias ląstelių linijas, kamienus arba pirmines ląstelių, tarp jų ir žmonių ląstelių kultūras (pvz., kuniško 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 reikiama  $\text{CO}_2$  koncentracijai, temperatūrai ir drėgmei). Reguliariai tikrinama, ar pripažintos ląstelių linijos ir kamienai išlaiko pastovų modalinį chromosomų skaičių, ar jos neužsikrėtusios mikoplazmomis, o jei yra užkrėstos, tai toliau nebenaudojamos. Turi būti žinoma ląstelių ciklo trukmė bei taikomos kultivavimo sąlygos.

##### 1.4.1.3. Kultūrų paruošimas

Gerai žinomos ląstelių linijos ir kamienai: ląstelės yra padauginamos iš kamieninių kultūrų, pasėjamos kultūrinėje terpėje tokiu tankumu, kad prieš ląsteles surenkant, kultūros nesulietų, po to jos inkubuojamos  $37\text{ }^\circ\text{C}$  temperatūroje.

Limfocitai: į kultūrinę terpę, turinčią mitogeno (pvz., fitohemagliutininą), įnešamas sveikų tiriamųjų kraujo, paveikto antikoagulantu (pvz., heparinu), mėginys arba iš to kraujo išskirti limfocitai ir inkubuojama  $37\text{ }^\circ\text{C}$  temperatūroje.

##### 1.4.1.4. Metabolinė aktyvacija

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

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

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

##### 1.4.1.5. Bandoma cheminė medžiaga (preparatas)

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

#### 1.4.2. Bandymo sąlygos

##### 1.4.2.1. Tirpiklis (nešiklis)

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

## 1.4.2.2. Veikimo koncentracijos

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

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

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

Kai medžiagos yra pakankamai necitotoksiškos, tai didžiausia bandomosios medžiagos koncentracija turėtų būti 5  $\mu\text{l/ml}$ , 5,5 mg/ml arba 0,01 M, priklausomai nuo to, kuri iš visų išvardytų koncentracijų yra pati mažiausia.

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

## 1.4.2.3. Neigiami ir teigiami kontroliniai mėginiai

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

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

Pasirenkamos tokios teigiamos kontrolinės dozės, kad gaunami poveikiai būtų ryškūs, bet tyrėjas ne iš karto atpažintų užkoduotą objektinį stiklę. 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
	etilnitrošlapalas	759-73-9	212-072-2
	mitomicinas C	50-07-7	200-008-6
	4-nitrokvinolino-N-oksidas	56-57-5	200-281-1
Egzogeninė metabolinė aktyvacija vyksta	benzopirenas	50-32-8	200-028-5
	ciklofosfamidas	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 nešiklio ir kurie paveikiami šia terpe lygiai taip pat kaip ir ląstelių kultūros. Taip pat reikia papildomai naudoti ir nepaveiktus kontrolinius mėginius, nekreipiant dėmesio į tai, kad anksčiau atliktų eksperimentų aprašuose nurodyta, jog pasirinktas tirpiklis nesukėlė jokio žalingo ar mutageninio poveikio.

#### 1.4.3. **Bandymo atlikimo metodika**

##### 1.4.3.1. *Veikimas bandomąja chemine medžiaga*

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

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

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

##### 1.4.3.3. *Kultūrų surinkimo laikas*

Atliekant pirmąjį eksperimentą, ląstelės, esant metabolinės aktyvacijos sistemai arba jai nesant bandomąja chemine medžiaga veikiamos 3–6 valandas ir yra surenkamos praėjus maždaug kas 1,5 normalaus ląstelinio ciklo nuo poveikio pradžios (12). Jeigu eksperimentas atliekamas pagal šį protokolą, esant metabolinės aktyvacijos sistemai arba jai nesant ir gaunami neigiami rezultatai, tai reikia atlikti papildomą poveikio bandomąja medžiaga eksperimentą, nesant metabolinės aktyvacijos sistemos ir ląstelės surenkamos, praėjus laiko tarpui, maždaug lygiam 1,5 ląstelinio ciklo trukmės. Kai kurios cheminės medžiagos yra lengviau nustatomos, jei bandomąja medžiaga veikiamas 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.

##### 1.4.3.4. *Chromosomų paruošimas*

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

##### 1.4.3.5. *Analizė*

Prieš pradėdant mikroskopinę analizę, visi objektiniai stikleliai, įskaitant teigiamus ir neigiamus kontrolinius mėginius, yra atskirai koduojami. Kadangi fiksavimo metu metafazėje esančios ląstelės dažnai suyra bei prarandamos chromosomos, tai suskaičiuotos ląstelės turės centromeras, kurių skaičius bus lygus visų tipų ląstelių modaliniam skaičiui  $\neq 2$ . 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 bandymo tikslas yra nustatyti chromosomų struktūrines aberacijas, svarbu poliploidiją bei endoduplikaciją registruoti tada, kai tai yra matoma.

## 2. **DUOMENYS**

### 2.1. **REZULTATŲ APDOROJIMAS**

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

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

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

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

## 2.2. REZULTATŲ ĮVERTINIMAS IR AIŠKINIMAS

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

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

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

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

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

## 3. ATASKAITA

### BANDYMO ATASKAITA

Bandymo ataskaitoje turi būti pateikta tokia informacija:

Tirpiklis (nešiklis):

- priešastys, dėl kurių buvo pasirinktas nešiklis,
- bandomosios medžiagos tirpumas ir stabilumas tirpiklyje (nešiklyje), jei žinomas.

Ląstelės:

- ląstelių tipas ir šaltinis,
- panaudoto ląstelių tipo kariotipo ypatybės ir tinkamumas,
- ar ląstelės neužsikrėtusios mikoplazmomis, jei taikoma,
- informacija apie ląstelinio ciklo trukmę,
- kraujo donorų, iš kurių buvo gauti viso kraujo mėginiai ar iš kurių kraujo buvo išskirti limfocitai, lytis bei panaudotas mitogenas,
- ląstelių persėjimų skaičius, jei taikoma,
- ląstelių kultivavimo metodai, jei taikoma,

- modalinis chromosomų skaičius.

Bandymo sąlygos:

- metafazę sustabdančios cheminės medžiagos prigimtis, koncentracija bei laiko tarpas, kurį ši medžiaga veikė ląsteles,
- pagrindinė priežastis, dėl kurios buvo pasirinktos koncentracijos ir ląstelių kultūrų kultivavimo skaičius nurodant, jei įmanoma, citotoksiškumo tyrimo duomenis ir tirpumo ribas,
- terpės sudėtis ir CO<sub>2</sub> koncentracija, jei taikoma,
- bandomosios medžiagos koncentracija,
- nešiklio tūris ir į jį įneštos bandomosios medžiagos tūris,
- inkubacijos temperatūra,
- inkubacijos laikas,
- veikimo bandomąja medžiaga trukmė,
- ląstelių tankis pasėjimo metu, jei taikoma,
- metabolinės aktyvacijos sistemos tipas ir sudėtis, įskaitant tinkamumo kriterijus,
- teigiami ir neigiami kontroliniai mėginiai,
- objektinių stiklelių paruošimo būdai,
- aberacijų vertinimo kriterijai,
- ištirtų metafazių skaičius,
- toksiškumo įvertinimo metodai,
- kriterijai, pagal kuriuos sprendžiama, ar bandymo metu gauti rezultatai teigiami, neigiami ar abejotini.

Rezultatai:

- toksiškumo požymiai, pvz., ląstelių kultūrų kolonijų susiliejo laipsnis, ląstelinio ciklo duomenys, ląstelių skaičius, mitozinis indeksas,
- precipitacijos požymiai,
- duomenys apie terpės, kurioje buvo atliekamas veikimas, pH ir osmosinį slėgį, jei tai buvo nustatyta,
- aberacijų, įskaitant plyšius, apibūdinimas,
- ląstelių, esančių bandomąja medžiaga veiktose bei kontrolinėse kolonijose ir turinčių chromosomų aberacijas, skaičius bei chromosomų aberacijų tipas,
- ploidiškumo pokyčiai, jei pastebimi,
- dozės ir atsako tarpusavio ryšys, jei tai įmanoma,

- statistinės analizės, jei tokios buvo atliktos,
- vienu metu gauti neigiamų (tirpiklis/nešiklis) ir teigiamų kontrolinių mėginių tyrimų duomenys,
- ankstesnių bandymų duomenys apie neigiamus (tirpiklis/nešiklis) ir teigiamus kontrolinius mėginius, kartu nurodant jų intervalus, vidurkius ir standartinius nukrypimus.

Rezultatų aptarimas.

Išvados.

#### 4. NUORODOS

- 1) Evans, h.J. (1976). Cytological Methods for Detecting Chemical Mutagens. In: Chemical mutagens, Principles and Methods for their Detection, Vol. 4, Hollaender, A. (ed) Plenum Press, New York and London, p. 1–29.
- 2) Ishidate, 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.
- 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 chromatid 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, M.Jr., 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., Bates, A.D., van Buul, P.P.W., Meijers, M. and de Vogei, N. (1976). Cytogenetic Effects of Mutagen/Carcinogens after Activation in a Microsomal System *in Vitro*, I. Induction of Chromosome Aberrations and Sister Chromatid Exchange by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes. *Mutation Res.*, 37, p. 83–90.
- 9) Matsuoka, A., Hayashi, M. and Ishidate, M. Jr. (1979). Chromosomal Aberration Tests on 29 Chemicals Combined with S9 Mix *In Vitro*. *Mutation Res.*, 66, p. 277–290.
- 10) Elliot, B.M., Combes, R.D., Elcombe, C.R., Gatehouse, D.G, Gibson, GG, Mackay, J.M. and Wolf, R.C. (1992). Report of UK Environmental Mutagen Society Working Party. Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *In Vitro* Genotoxicity Assays. *Mutagenesis*, 7, p. 175–177.
- 11) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976). A SAFE Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems. In: de Serres, F.J., Fouts, J.R., Bend, J.R. and Philpot, R.M. (eds) *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing, Elsevier, North-Holland, p. 85–88.
- 12) Galloway, S.M., Aardema, M.J., Ishidate, M.Jr., 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.
- 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.11. MUTAGENIŠKUMAS – ŽINDUOLIŲ KAULŲ ČIULPŲ CHROMOSOMŲ ABERACIJOS BANDYMAS *IN VIVO*****1. METODAS**

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

**1.1. ĮVADAS**

Žinduolių chromosomų aberacijų bandymas *in vitro* naudojamas nustatyti struktūrinėms chromosomų aberacijoms, kurias bandomoji cheminė medžiaga sukelia žinduolių, paprastai graužikų, kaulų čiulpų ląstelėse (1) (2) (3) (4). Chromosomų struktūrinės aberacijos gali būti dviejų tipų – chromosominės arba chromatidinės. 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 bandymui paprastai naudojamas graužikų stuburo skliautas. Pagrindinis bandomasis audinys yra kaulų čiulpai, kadangi jie yra išvagoti kraujagyslių, o be to, kaulų čiulpuose yra daug greitai besidauginančių ląstelių, kurios yra lengvai išskiriamos ir apdorojamos. Šio bandymo metu nėra bandomi kitų rūšių žinduoliai bei jų audiniai.

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

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

Taip pat žr. Bendrojo įvado B dalį.

**1.2. APIBRĖŽTYS**

**Chromatidinė aberacija** – struktūrinis chromosomos pakenkimas, pasireiškiantis kaip pavienių chromatidžių suardymas arba kaip chromatidžių suardymas ir susijungimas.

**Chromotidinė aberacija** – struktūrinis chromosomos pakenkimas, pasireiškiantis kaip abiejų seserinių chromatidžių trūkis arba kaip jų abiejų trūkis ir susijungimas toje pačioje vietoje.

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

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

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

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

**Poliploidiskumas** – haploidinio chromosomų skaičiaus ( $n$ ), išskyrus diploidinį skaičių (t. y.  $3n$ ,  $4n$  ir t. t.), kartotinis.

**Struktūrinė aberacija** – chromosomos struktūros pokytis, kurį galima nustatyti dalijimosi ciklo metafazėje esančias ląsteles tiriant mikroskopu; jis pasireiškia kaip delecijos ir fragmentai, pokyčiai grandinių viduje ar tarp grandinių.

**1.3. BANDYMO METODO PRINCIPAS**

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



## 1.4. BANDYMO METODO APIBŪDINIMAS

## 1.4.1. Preparatai

## 1.4.1.1. Gyvūnų rūšies pasirinkimas

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

## 1.4.1.2. Laikymo ir maitinimo sąlygos

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

## 1.4.1.3. Gyvūnų paruošimas

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

## 1.4.1.4. Dozių paruošimas

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

## 1.4.2. Bandymo sąlygos

## 1.4.2.1. Tirpiklis (nešiklis)

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

## 1.4.2.2. Kontroliniai mėginiai

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

Teigiamuose kontroliniuose mėginiuose, paveiktuose tokia pačia bandomosios cheminės medžiagos doze *in vivo*, turi būti aptinkamos struktūrinės aberacijos, kurioms esant, bei veikiant bandomąja medžiaga, būtų galima nesunkiai sumažinti pašalinį foną pakartotinai, o tai parodo bandomosios sistemos jautrumą. Pasirenkamos tokios teigiamos kontrolinės dozės, kad gaunami poveikiai būtų ryškūs, bet tyrėjas ne iš karto atpažintų užkoduotus objektinius stiklelius. Priimtina, kad teigiami kontroliniai mėginiai būtų suleisti gyvūnams tokiu būdu, kuris skiriasi nuo bandomosios cheminės medžiagos suleidimo būdo bei būtų tik vieną 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 nitrošlapalas	759–73–9	212–072–2
mitomicinas C	50–07–7	200–008–6
ciklofosfamidai ciklofosfamido monohidratas	50–18–0 6055–19–2	200–015–4
trietilenmelaminas	51–18–3	200–083–5

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

#### 1.5. BANDYMO EIGA

##### 1.5.1. Gyvūnų skaičius ir lytis

Kiekvienoje bandomojoje ir kontrolinėje grupėje turi būti ne mažiau kaip po 5 kiekvienos lyties gyvūnus. Jei bandymo metu galima gauti anksčiau atliktų bandymų, kuriems naudota ta pati gyvūnų rūšis ir tas pats veikimo bandomąja medžiaga būdas, duomenų, kurie rodo, kad toksiškumas abiem lytims nelabai skiriasi, užtenka iširti vienos lyties gyvūnus. Jeigu žmogaus sąlytis su bandomąja medžiaga priklauso nuo lyties, pvz., kai kurių farmakologiškai aktyvių medžiagų atveju, reikia iširti atitinkamos lyties gyvūną.

##### 1.5.2. Veikimo tvarkaraštis

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

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

Prieš numarinant, gyvūnams suleidžiama intraperitoninė injekcija su atitinkama doze metafazėje sustabdančios veikliosios medžiagos (pvz., Kolcemido® ar kolchicino). Po atitinkamo intervalo iš gyvūnų paaimami 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. Dozių dydis

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

##### 1.5.4. Ribinis bandymas

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

##### 1.5.5. Dozių davimas

Bandomoji medžiaga paprastai yra suduodama per vamzdelį, įvestą į skrandį, inkubacine kaniule arba suleidžiant intraperitoninę injekciją. Bandomąją medžiagą galima įterpti ir kitais būdais, jei jie yra pagrįdžiami. Maksimalus skysčio, priverstinai duodamo per vamzdelį arba išvirksčiama į pilvą vienu metu, tūris priklauso nuo bandomojo gyvūno dydžio. Tūris neturi viršyti 2 ml/100 g kūno masės. Didesnio nei šis tūrio davimas turi būti pagrįdžiamas. Išskyrus dirginančias ar esdinančias medžiagas, kurių didesnės koncentracijos sukelia labai

sunkų poveikį, bandomosios medžiagos tūrio kitimas turi būti sumažinamas iki minimumo, koncentraciją taip sureguliuojant, kad esant visiems dozės lygiams, tūris būtų pastovus.

#### 1.5.6. Chromosomų paruošimas

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

#### 1.5.7. Analizė

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

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

## 2. DUOMENYS

### 2.1. REZULTATŲ APDOROJIMAS

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

### 2.2. REZULTATŲ ĮVERTINIMAS IR AIŠKINIMAS

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

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

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

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

Tiriant chromosomų aberacijas *in vitro*, teigiami rezultatai, gauti atlikus bandymą, rodo, kad bandomoji medžiaga sukelia chromosomų aberacijas tirtos gyvūnų rūšies kaulų čiulpų ląstelėse. Neigiami rezultatai rodo, kad esant bandymo sąlygoms, bandomoji medžiaga nesukelia chromosomų aberacijų tirtos gyvūnų rūšies kaulų čiulpų ląstelėse.

Reikia aptarti tą galimybę, ar bandomoji medžiaga ar jos metabolitai pasieks bendrąją apytaką ar tik tikslinį audinį (pvz., sisteminio toksiškumo atveju).

### 3. ATASKAITA

#### 3.1. BANDYMO ATASKAITA

Bandymo ataskaitoje turi būti pateikiama tokia informacija:

Tirpiklis (nešiklis):

- priešastys, dėl kurių buvo pasirinktas nešiklis,
- bandomosios cheminės medžiagos, esančios tirpiklyje (nešiklyje), tirpumas ir stabilumas, jei toks yra žinomas.

Bandomieji gyvūnai:

- panaudota rūšis ar veislė,
- gyvūnų skaičius, amžius ir lytis,
- šaltinis, laikymo sąlygos, maitinimas ir pan.,
- kiekvieno gyvūno svoris prieš pradėdant bandymą ir kiekvienos grupės svorio intervalas, vidurkiai bei standartinis nukrypimas.

Bandymo sąlygos:

- teigiami ir neigiami (tirpiklis/nešiklis) kontroliniai mėginiai,
- intervalo nustatymo bandymo, jei jis buvo vykdomas, duomenys,
- dozių dydžio pasirinkimo priešastys,
- bandomosios medžiagos paruošimo apibūdinimas,
- bandomosios medžiagos davimo apibūdinimas,
- priešastys, nulėmusios davimo būdo pasirinkimą,
- metodai, kuriais patvirtinama, kad bandomoji cheminė medžiaga pateko į bendrąją apytaką ar į tikslinį audinį, jei taikoma,
- bandomosios cheminės medžiagos, esančios pašaruose ir geriamajame vandenyje, koncentracijos (pm) pervertimas į tikrąją dozę (mg/kg kūno masės/dienai), jei taikoma,
- duomenys apie pašarų ir geriamojo vandens kokybę,
- išsami informacija apie veikimą bandomąja medžiaga ir mėginio paėmimo tvarkaraštį,
- toksiškumo įvertinimo metodai,
- metafazę sustabdančios medžiagos prigimtis, jos koncentracija bei veikimo trukmė,
- objektinių stiklelių paruošimo būdai,

- aberacijų įvertinimo kriterijai,
- ląstelių, kurios buvo išskirtos iš vieno gyvūno bei išanalizuotos, skaičius,
- teigiamų, neigiamų ar abejotinų rezultatų nustatymo kriterijai.

Rezultatai:

- toksiškumo požymiai,
- mitozinis indeksas,
- kiekvieno gyvūno ląstelėse esančių aberacijų tipas ir skaičius,
- absoliutus aberacijų vieno grupės gyvūnų ląstelėse skaičius, kartu nurodant vidurkius ir standartinius nukrypimus,
- ląstelių su aberacijomis skaičius, kartu nurodant vidurkius ir standartinius nukrypimus,
- ploidiskumo pasikeitimai, jei buvo tokie pastebėti,
- dozės ir atsako tarpusavio ryšys, jei tai įmanoma nurodyti,
- statistinės analizės, jei tokios buvo atliktos,
- vienu metu gauti neigiami kontroliniai duomenys,
- anksčiau gauti neigiami kontroliniai duomenys, kartu pateikiant jų intervalus, vidurkius ir standartinius nukrypimus,
- vienu metu gauti teigiami kontroliniai duomenys.

Rezultatų aptarimas.

Išvados.

#### 4. NUORODOS

- 1) Adler, ID. (1984). Cytogenetic Tests in Mammals. In: Mutagenicity Testing: a Practical Approach. S. Venitt and J.M. Parry (Eds). IRL Press, Oxford, Washington D.C., p. 275–306.
- 2) Preston, R.J., Dean, B.J., Galloway, S., Holden, h., McFee, A.F. and Shelby, M. (1987). Mammalian *In Vivo* Cytogenetic Assays: Analysis of Chromosome Aberrations in Bone Marrow Cells. Mutation Res., 189, p. 157–165.
- 3) Richold, M., Chandley, A., Ashby, J., Gatehouse, D.G., Bootman, J. and Henderson, L. (1990). *In Vivo* Cytogenetic Assays. In: D.J. Kirkland (Ed.) Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, p. 115–141.
- 4) Tice, R.R., Hayashi, M., MacGregor, J.T., Anderson, D., Blakey, D.H., Holden, h.E., Kirsch-Volders, M., Oleson Jr., F.B., Pacchierotti, F., Preston, R.J., Romagna, F., Shimada, h., Sutou, S. and Vannier, B. (1994). Report from the Working Group on the *in Vivo* Mammalian Bone Marrow Chromosomal Aberration Test. Mutation Res., 312, p. 305–312.

- 5) Fielder, R.J., Allen, J.A., Boobis, A.R., Botham, P.A., Doe, J., Esdaile, D.J., Gatehouse, D.G., Hodson-Walker, G, Morton, D.B., Kirkland, D.J. and Richold, M. (1992). Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays. *Mutagenesis*, 7, p. 313–319.
- 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.12. MUTAGENIŠKUMAS – ŽINDUOLIŲ ERITROCITŲ MAŽŪJŲ BRANDUOLIŲ BANDYMAS IN VIVO****1. METODAS**

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

**1.1. ĮVADAS**

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

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

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

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

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

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

Taip pat žr. Bendrojo įvado B dalį.

**1.2. APIBRĖŽTYS**

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

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

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

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

### 1.3. BANDYMO METODO PRINCIPAS

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

### 1.4. BANDYMO METODO APIBŪDINIMAS

#### 1.4.1. **Preparatai**

##### 1.4.1.1. *Gyvūnų rūšies pasirinkimas*

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

##### 1.4.1.2. *Laikymo ir šėrimo sąlygos*

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

##### 1.4.1.3. *Gyvūnų paruošimas*

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

##### 1.4.1.4. *Dozių paruošimas*

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

#### 1.4.2. **Bandymo sąlygos**

##### 1.4.2.1. *Tirpiklis arba nešiklis*

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

##### 1.4.2.2. *Kontroliniai gyvūnai*

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



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

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

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

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

## 1.5. BANDYMO EIGA

### 1.5.1. Gyvūnų skaičius ir lytis

Kiekvienoje bandomojoje ir kontrolinėje grupėje turi būti mažiausiai po 5 analizei tinkamus kiekvienos lyties gyvūnus (11). Jei bandymo metu galima gauti anksčiau atliktų bandymų, kuriems naudota ta pati gyvūnų rūšis ir tas pats veikimo bandomąją medžiagą būdas, duomenų, kurie rodo, kad toksiškumas abiem lytims nelabai skiriasi, užtenka ištirti vienos lyties gyvūnus. Jeigu žmogaus sąlytis su bandomąją medžiaga priklauso nuo lyties, pvz., kai kurių farmakologiškai aktyvių medžiagų atveju, reikia ištirti atitinkamos lyties gyvūną.

### 1.5.2. Veikimo tvarkaraštis

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

Bandymas gali būti atliekamas 2 būdais:

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

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

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

#### 1.5.3. Dozės dydis

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

#### 1.5.4. Ribinis bandymas

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

#### 1.5.5. Dozių davimas

Bandomoji medžiaga paprastai yra suduodama per vamzdelį, įvestą į skrandį, inkubacine kaniule arba suleidžiant intraperitoninę injekciją. Bandomąją medžiagą galima įterpti ir kitais būdais, jei jie yra pagrindžiami. Maksimalus skysčio, priverstinai duodamo per vamzdelį arba išvirksčiamo į pilvą vienu metu, tūris priklauso nuo bandomojo gyvūno dydžio. Tūris neturi viršyti 2 ml/100 g kūno masės. Didensnio nei šis tūrio davimas turi būti pagrindžiamas. Išskyrus dirginančias ar esdinančias medžiagas, kurių didesnės koncentracijos sukelia labai sunkų poveikį, bandomosios medžiagos tūrio kitimas turi būti sumažinamas iki minimumo, koncentraciją taip sureguliuojant, kad esant visiems dozės lygiams, tūris būtų pastovus.

#### 1.5.6. Kaulų čiulpų/kraujo paruošimas

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

#### 1.5.7. Analizė

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

## 2. DUOMENYS

### 2.1. REZULTATŲ APDOROJIMAS

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

### 2.2. REZULTATŲ ĮVERTINIMAS IR AIŠKINIMAS

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

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

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

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

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

## 3. ATASKAITA

### BANDYMO ATASKAITA

Bandymo ataskaitoje turi būti pateikiama tokia informacija:

Tirpiklis/nešiklis:

- nešiklio pasirinkimo pagrindimas,
- bandomosios cheminės medžiagos tirpumas ir stabilumas tirpiklyje/nešiklyje, jei žinomas.

Bandomieji gyvūnai:

- panaudota rūšis ar veislė,
- gyvūnų skaičius, amžius ir lytis,
- šaltinis, laikymo sąlygos, pašaras ir pan.,
- kiekvieno gyvūno svoris prieš pradėdant bandymą ir kiekvienos grupės svorio intervalas, vidurkiai bei standartinis nuokrypis.

## Bandymo sąlygos:

- teigiami ir neigiami (tirpiklis/nešiklis) kontroliniai mėginiai,
- ribų paieškos bandymo, jei jis buvo vykdomas, rezultatai,
- dozių dydžių pasirinkimo priežastys,
- duomenys apie bandomosios medžiagos paruošimą,
- duomenys apie veikimą bandomąja medžiaga,
- pagrindinė priežastis, nulėmusi veikimo būdo pasirinkimą,
- metodai, kuriais patvirtinama, kad bandomoji cheminė medžiaga pateko į bendrąją apytaką ar tikslinį audinį, jei taikoma,
- bandomosios cheminės medžiagos, esančios pašaruose ir geriamajame vandenyje, koncentracijos (pm) paverčimas į tikrąją dozę (mg/kg kūno masės/dienai), jei taikoma,
- duomenys apie pašarų ir geriamojo vandens kokybę,
- išsamus veikimo bandomąja medžiaga ir mėginio paėmimo tvarkaraščio aprašymas,
- objektinių stiklelių paruošimo metodai,
- toksiškumo matavimo metodai,
- nesubrendusių eritrocitų, turinčių mažuosius branduolius, skaičiavimo kriterijai,
- iš vieno gyvūno išskirtų bei išanalizuotų ląstelių skaičius,
- teigiamų, neigiamų ar abejotinių rezultatų nustatymo kriterijai.

## Rezultatai:

- toksiškumo požymiai,
- nesubrendusių ir subrendusių eritrocitų skaičiaus santykis,
- kiekvieno gyvūno nesubrendusių eritrocitų, turinčių mažuosius branduolius, skaičius,
- kiekvienos grupės nesubrendusių eritrocitų, turinčių mažuosius branduolius, skaičiaus vidurkis ir standartinis nuokrypis,
- dozės ir atsako tarpusavio ryšys, jei tai įmanoma nurodyti,
- statistinės analizės ir metodai, jei taikyti,
- lygiagrečiai gaunamų ir ankstesnių neigiamų kontrolinių mėginių duomenys,
- lygiagrečiai gaunamų teigiamų kontrolinių mėginių duomenys.

Rezultatų aptarimas.

Išvados.

#### 4. NUORODOS

- 1) Heddle, J.A. (1973). A Rapid *In Vivo* Test for Chromosomal Damage, *Mutation Res.*, 18, p. 187–190.
- 2) Schmid, W. (1975). The Micronucleus Test, *Mutation Res.*, 31, p. 9–15.
- 3) Heddle, J.A., Salamone, M.F., Hite, M., Kirkhart, B., Mavournin, K., MacGregor, J.G. and Newell, G.W. (1983). The Induction of Micronuclei as a Measure of Genotoxicity. *Mutation Res.* 123, p. 61–118.
- 4) Mavournin, K.H., Blakey, D.H., Cimino, M.C., Salamone, M.F. and Heddle, J.A. (1990). The *In Vivo* Micronucleus Assay in Mammalian Bone Marrow and Peripheral Blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, *Mutation Res.*, 239, p. 29–80.
- 5) MacGregor, J.T., Schlegel, R., Choy, W.N., and Wehr, C.M. (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, C.M. and Langlois, R.G. (1983). A Simple Fluorescent Staining Procedure for Micronuclei and RNA in Erythrocytes Using Hoechst 33258 and Pyronin Y. *Mutation Res.*, 120, p. 269–275.
- 16) Romagna, F. and Staniforth, C.D. (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.
- 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.13/14. MUTAGENIŠKUMAS – BAKTERIJŲ GRĮŽTAMŪJŲ MUTACIJŲ BANDYMAS****1. METODAS**

Šis metodas atitinka OECD TG 471 – Bakterijų grįžtamųjų mutacijų bandymą (1997).

**1.1. ĮVADAS**

Bakterijų grįžtamųjų mutacijų bandymui naudojami *Salmonella typhimurium* ir *Escherichia coli* kamienai, kuriems reikalingos aminorūgštys, ir juo siekiama nustatyti taškines mutacijas, kurios atsiranda dėl vienos ar kelių DNR bazių porų pakaitos, intarpų ar delecijos (1)(2)(3). Šio bakterijų grįžtamųjų mutacijų bandymo esmė ta, kad juo nustatomos mutacijos, dėl kurių bandomųjų kamienų mutacijos atsistato į pirmykštę padėtį ir atsikuria bakterijų funkcinis gebėjimas sintetinti būtiną amino rūgštį. Bakterijos-revertantai aptinkamos pagal jų sugebėjimą augti terpėje, kurioje nėra amino rūgšties, reikalingos jų tėviniam bandomajam kamienui.

Daugelio žmonių genetiškai paveldimų ligų priežastis yra taškinės mutacijos bei su jomis susiję įvykiai, ir egzistuoja pakankamai įrodymų, kad dėl somatinėse ląstelėse esančių onkogenų bei navikų supresorinių genų taškinių mutacijų formuojasi žmonių ir eksperimentinių gyvūnų navikai. Bakterijų grįžtamųjų mutacijų bandymas yra nebrangus ir greitai bei pakankamai lengvai atliekamas. Dauguma bandomųjų kamienų pasižymi keletu ypatybių, pagal kurias lengva nustatyti jų mutacijas, įskaitant DNR sekose, esančiose grįžtamųjų mutacijų vyksmo vietose bei sukuriančiose atsaką į signalą, padidintą ląstelių pralaidumą didelės molekulinės masės molekulėms ir DNR pažeidimų atstatymo sistemų sunaikinimą arba pažeidoms atsparių DNR atkūrimo procesų suintensyvėjimą. Tiriant kamienų specifiskumą gaunama vertingos informacijos apie genotoksiškų medžiagų sukeltų mutacijų tipus. Yra sukaupta labai didelė grįžtamųjų mutacijų bandymų rezultatų duomenų bazė, kurioje yra duomenų apie įvairiausias struktūras, ir yra sukurta visuotinai pripažintų metodų cheminėms medžiagoms, įskaitant lakiuosius junginius, pasižyminčioms skirtingomis fizikinėmis bei cheminėmis savybėmis, tirti.

Taip pat žr. Bendrojo įvado B dalį.

**1.2. APIBRĖŽTYS**

**Grįžtamųjų mutacijų bandymas** – bandymas, kuriuo *Salmonella typhimurium* arba *Escherichia coli* kamienuose, kuriems reikalinga aminorūgštis (atitinkamai histidinas ar triptofanas), nustatoma mutacija, dėl kurios atsiranda kamienas, kuriam nereikalinga aminorūgštis, tiekama egzogeniniu būdu.

**Mutagenai, sukeliantys bazių porų pakaitas** – medžiagos, sukeliančios DNR bazių porų pakaitas. Atliekant reversijos bandymą, ši pakaita gali vykti pradinės mutacijos ar kitoje bakterijos genomo vietoje.

**Mutagenai, sukeliantys skaitymo rėmelio poslinkį** – medžiagos, sukeliančios vienos ar kelių DNR bazių porų intarpus ar delecijas, dėl kurių pasislenka RNR molekulėje esantis skaitymo rėmelis.

**1.3. PRADINIAI SVARSTYMAI**

Atliekant bakterijų grįžtamųjų mutacijų bandymą naudojamos prokariotinės ląstelės, kurios skiriasi nuo žinduolių ląstelių pagal tokius veiksnius kaip medžiagų transportas į ląstelę, metabolizmas, chromosomų struktūra bei DNR pažeidimų atstatymo procesai. Paprastai atliekant bandymus *in vitro*, reikia naudoti egzogeninį metabolinės aktyvacijos šaltinį. Metabolinės aktyvacijos sistemos *in vitro* negali absoliučiai imituoti žinduolių metabolinės aktyvacijos sąlygų *in vivo*. Taigi atliekant bandymą negaunama tiesioginės informacijos apie cheminių medžiagų mutageniškumą ir kancerogeniškumą žinduoliams.

Bakterijų grįžtamųjų mutacijų bandymas paprastai naudojamas kaip pirminė atranka siekiant nustatyti genotoksinį aktyvumą, o ypač gebėjimą sukelti taškines mutacijas. Gausi duomenų bazė parodė, kad daugelio cheminių medžiagų, su kuriomis atlikus šį bandymą gauti teigiami rezultatai, mutageninės savybės patvirtinamos ir kitais bandymais. Tačiau šiuo bandymu galima nustatyti ne visus mutagenus; priežastys gali būti šio bandymo pagrindinio tikslo specifika, metabolinės aktyvacijos skirtumai ar mutagenų biologinio įsisavinamumo skirtumai. Kita vertus, dėl veiksnių, padidinančių bakterijų grįžtamųjų mutacijų bandymo jautrumą, mutageninis medžiagų aktyvumas gali būti pervertintas.

Bakterijų grįžtamųjų mutacijų bandymas netinka konkrečių cheminių medžiagų klasėms, pavyzdžiui junginiams, pasižymintiems pernelyg dideliu baktericidiniu aktyvumu (konkretūs antibiotikai) ir tiems junginiams, kurie, kaip manoma, blokuoja žinduolių ląstelių DNR replikacijos sistemą (keletas topoizomerazių inhibitorių ir nukleozidų analogų). Tokiais atvejais labiau tinka žinduolių mutacijų bandymai.



Nors cheminiai junginiai, kuriuos tiriant šiuo bandymu gaunamas teigiamas rezultatas, yra kancerogeniški žinduoliams, tačiau šis tarpusavio ryšys nėra absoliutus. Tai priklauso nuo cheminių medžiagų klasės ir atliekant šį bandymą neįmanoma nustatyti tam tikrų kancerogenų, kadangi jų veikimo mechanizmai nepagrįsti genotoksiškumu arba nėra būdingi bakterijų ląstelėms.

#### 1.4. BANDYMO METODO PRINCIPAS

Bakterijų ląstelių suspensijos veikiamos bandomąja medžiaga naudojant egzogeninę metabolinės aktyvacijos sistemą arba jos nenaudojant. Pagal inkorporacijos į lėkštelę metodą šios suspensijos padengiamos agaru ir užliejamos ant minimalios terpės. Pagal išankstinės inkubacijos metodą suspensija iš pradžių inkubuojama su medžiaga, kuria bus veikiamos bakterinės ląstelės, o vėliau padengiama agaru ir po to užpilama ant minimalios terpės. Panaudojant abu metodus ir praėjus 2–3 inkubacijos dienoms, skaičiuojamos revertantų kolonijos ir lyginamos su spontaniųjų revertantų kolonijomis, auginamomis kontrolinėse lėkštelėse, tirpiklyje, skaičiumi.

Aprašytos kelios bakterijų grįžtamųjų mutacijų bandymo procedūros. Dažniausiai naudojami inkorporacijos į lėkštelę (1)(2)(3)(4), išankstinės inkubacijos (2)(3)(5)(6)(7)(8), fliktuacijos (9)(10) ir suspendavimo metodai. Taipogi buvo aprašytos dujinių ir lakiųjų medžiagų bandymo modifikacijos (12).

Šiame bandymų metode aprašytos su inkorporacijos į lėkštelę ir išankstinės inkubacijos metodais susijusios procedūros. Abu šie metodai tinka eksperimentams, kurių metu naudojama ir kurių metu nenaudojama metabolinė aktyvacijos sistema, atlikti. Tam tikros medžiagos išankstinės inkubacijos metodu nustatomos veiksmingiau. Tai medžiagos, priklausančios tokioms cheminių medžiagų klasėms kaip alifatiniai aminorai, turintys trumpąją grandinę, divalenčiai metalai, turintys NO grupę, alkaloidai, turintys pirolizidiną, alilo grupę turintys junginiai bei azoto junginiai (3). Taip pat pripažįstama, kad naudojant tokius standartinius bandymų metodus kaip inkorporacijos į lėkštelę bei išankstinės inkubacijos metodai ne visada galima nustatyti tam tikrų klasių mutagenus. Tokie mutagenai laikytini „ypatingais atvejais“ ir griežtai rekomenduojama juos nustatyti pagal kitas metodikas. Nustatyti tokie „ypatingi atvejai“ (kartu nurodomi galimų jų nustatymo metodų pavyzdžiai): – azodazai ir diazo junginiai (3)(5)(6)(13), dujos bei lakiosios cheminės medžiagos (12)(14)(15)(16) ir glikozidai (17)(18). Nukrypimas nuo standartinės bandymo atlikimo metodikos turi būti mokslškai pagrįstas.

#### 1.5. BANDYMO METODO APRAŠYMAS

##### 1.5.1. Preparatai

##### 1.5.1.1. Bakterijos

Grynos bakterijų kultūros auginamos tol, kol pasiekia vėlyvąją eksponentinę arba ankstyvąją stacionarinę augimo fazę apie  $10^9$  ląstelių/ml). Kultūros, pasiekusios vėlyvąją stacionarinę augimo fazę, neturi būti naudojamos. Svarbu yra tai, kad bakterijų kultūrose, kurios naudojamos eksperimentams, būtų didelis gyvų bakterijų ląstelių titras. Titras nustatomas arba pagal anksčiau gautas augimo kreives arba kiekvieno bandymo metu nustatant gyvų ląstelių skaičių pagal jų augimą lėkštelėje.

Rekomenduojama inkubacijos temperatūra yra 37 °C

Turi būti naudojami mažiausiai 5 bakterijų kamienai. Jų tarpe turi būti keturi *Salmonella typhimurium* kamienai (TA 1535, TA 1537 arba TA 97a arba TA 97; TA 98 ir TA 100), kurie, kaip buvo įrodyta daugelyje laboratorijų, yra patikimi ir atkuria atsaką. Šių keturių *Salmonella typhimurium* kamienų pirminės reversijos vietoje lokalizuota GC bazių pora ir yra žinoma, kad panaudojant šiuos kamienus, negalima identifikuoti kryžmiškai rišančių mutagenų ir hidrazinų. Šios medžiagos nustatomos, panaudojant *Escherichia coli* WP2 ir *Salmonella typhimurium* TA 102 kamienus (19), kurių pirminėje reversijos vietoje lokalizuota AT bazių pora. Taigi rekomenduojamas toks kamienų derinys:

- *S. typhimurium* TA1535 ir
- *S. typhimurium* TA1537 arba TA97 arba TA97a ir
- *S. typhimurium* TA98 ir
- *S. typhimurium* TA100 ir
- *E. coli* WP2 uvrA arba *E. coli* WP2 uvrA (pKM10l) arba *S. typhimurium* TA102.



Siekiant nustatyti kryžmiškai surišančius mutagenus patartina papildomai panaudoti *S. typhimurium* TA 102 arba *E. coli* [pvz. *E. coli* WP2 arba *E. coli* WP2 (pKM101)] kamienus, sugebančius taisyti DNR pažaidas.

Reikia naudoti gerai žinomas pagrindinės kultūros paruošimo, žymeklių patvirtinimo bei saugojimo metodikas. Turi būti įrodyta, kad aminorūgštis yra būtina kiekvieno preparato, paruošto iš užšaldytos pradinės kultūros, augimui (histidinas – *S. typhimurium* kamienams, o triptofanas – *E. coli* kamienams). Panašiai turi būti patikrintos kitos fenotipinės charakteristikos: R-faktorių turinčių plazmidžių buvimas arba nebuvimas, jei tai yra reikalinga [t. y. kamienų TA 98, TA 100 ir TA 97a arba TA 97, WP 2 uvrA ir WP 2 uvrA (pKM 101) atsparumas ampicilinui bei kamieno TA 102 atsparumas ampicilinui ir tetraciklinui], taip pat būdingų mutacijų buvimas (*S. typhimurium* rfa mutacija pagal jautrumą violetinei šviesai, *E. coli* uvr A mutacija arba *S. typhimurium* uvr B mutacija pagal jautrumą ultravioletinei šviesai) (2)(3). Kamienai taip pat turi spontaniškai sukurti revertantų kolonijas, kurių dažnis atitiktų ankstesnius laboratorijos duomenis ir literatūroje nurodytas ribas.

#### 1.5.1.2. *Terpė*

Naudojamas atitinkamas minimalus agaras (pavyzdžiui, turintis minimalios Vogel-Bonner terpės E ir gliukozės) ir ant viršaus užliejamas agaras, turintis histidino ir biotino arba triptofano tam, kad vyktų keli ląstelių dalijimaisi (1)(2)(9).

#### 1.5.1.3. *Metabolinė aktyvacija*

Bakterijos turi būti veikiamos bandomąja medžiaga naudojant atitinkamą metabolinės aktyvacijos sistemą ir nenaudojant tokios sistemos. Plačiausiai vartojama sistema yra iš graužikų kepenų, paveiktų tokiais fermentiniais aktyvumą skatinančiomis medžiagomis kaip AROCLOR 1254 (1)(2) ar fenobarbitono ir P-naftoflavono mišiniu (18)(20)(21), post-mitochondrinė frakcija, praturtinta kofaktoriumi. Post-mitochondrinė frakcija paprastai vartojama koncentracijomis, kurių intervalas S9 mišinyje siekia nuo 5 iki 30 % (v/v). Metabolinės aktyvacijos sistema pasirenkama priklausomai nuo bandomosios cheminės medžiagos klasės. Kai kuriais atvejais tikslinga naudoti daugiau nei vieną post-mitochondrinės frakcijos koncentraciją. Tiriant azodažus ir diazo junginius, gali būti tikslingiau naudoti redukcinę metabolinę aktyvacijos sistemą (6)(13).

#### 1.5.1.4. *Bandomoji medžiaga/preparatas*

Kietosios bandomosios medžiagos turi būti ištirpinamos arba suspenduojamos atitinkamuose tirpikliuose ar nešikliuose ir, jei reikia, praskiedžiamos prieš veikiant jomis bakterijas. Skystosios bandomosios medžiagos įnešamos tiesiogiai į bandymo sistemas ir (arba) praskiedžiamos prieš veikiant jomis bakterijas. Kiekvieno bandymo metu turi būti paruošiami švieži preparatai, nebent būtų stabilumo tyrimo duomenų, rodančių, kad bandomąsias medžiagas galima saugoti.

Tirpiklis/nešiklis turi nereaguoti su bandomąja medžiaga ir nekelti pavojaus, kad bakterijos neišgyvens bei būti suderinamas su S9 aktyvumu (22). Jeigu naudojami gerai nežinomi tirpikliai (nešikliai), reikia turėti jų tinkamumą pagrindžiančių duomenų. Jei įmanoma, tai pirmiausia rekomenduojama naudoti vandeninį tirpiklį (nešiklį). Kai bandomos vandenyje nestabilios cheminės medžiagos, naudojamuose organiniuose tirpikliuose neturi būti vandens.

### 1.5.2. **Bandymo sąlygos**

#### 1.5.2.1. *Bandomieji kamienai (žr. 1.5.1.1.)*

#### 1.5.2.2. *Veikimo koncentracija*

Kriterijai, į kuriuos reikia atsižvelgti nustatant didžiausią bandomosios medžiagos koncentraciją, yra medžiagos citotoksiškumas ir tirpumas galutiniame veikimo mišinyje.

Gali būti naudinga toksiškumą bei netirpumą nustatyti parengiamojo eksperimento metu. Citotoksiškumas gali būti nustatomas pagal revertantų kolonijų skaičiaus sumažėjimą, šalutinės terpės praskaidrėjimą ar sunykimą arba pagal kultūrų, paveiktų bandomąja medžiaga, išgyvenimo laipsnį. Medžiagos citotoksiškumas gali kisti dėl metabolinės aktyvacijos sistemų naudojimo. Netirpumas turėtų būti įvertinamas plika akimi stebint precipitato susidarymą eksperimento metu galutiniame reakciniame mišinyje.

Maksimali rekomenduojama bandomų tirpių, citotoksiškumu nepasižyminčių medžiagų koncentracija yra 5 mg/lėkštelėje arba 5 µl/lėkštelėje. Citotoksiškumu nepasižyminčių ir netirpių (koncentracijai esant 5 mg/lėkštelėje arba 5 µl/lėkštelėje) medžiagų atveju reikia ištirti vieną ar daugiau koncentracijų, kurioms esant medžiagos netirpsta galutiniame reakciniame mišinyje. Bandomosios medžiagos, kurios yra citotoksiškos, kai jų koncentracija yra mažesnė nei 5 mg/lėkštelėje arba 5 µl/lėkštelėje, turi būti bandomos tol, kol nustatoma koncentracija, kuriai esant medžiagos pasižymi citotoksiniu aktyvumu. Precipitato susidarymas neturi trukdyti įvertinti duomenis.

Per pirminį eksperimentą reikia išbandyti mažiausiai 5 išanalizuojamas bandomosios medžiagos koncentracijas, kurių vertės skirtų intervalai, lygūs pusei log ( $\sqrt{10}$ ). Mažesni skiriamieji intervalai tinka tada, kai bandoma atsako priklausomybė nuo koncentracijos. Koncentracija, didesnė už 5 mg/lėkšteleje arba 5 µl/lėkšteleje, gali būti pasirenkama tuo atveju, jei bandomosiose medžiagose yra didelis mutageniškų priemaišų kiekis.

### 1.5.2.3. Neigiami ir teigiami kontroliniai mėginiai

Kiekvieno bandymo metu kartu naudojami neigiami (tirpiklis ar nešiklis) bei teigiami bakterijų kamienai būdingi kontroliniai mėginiai taikant metabolinę aktyvumą ir jos netaikant.

Kai bandymų metu naudojama metabolinės aktyvacijos sistema, tai teigiama kontrolinė etaloninė medžiaga pasirenkama pagal naudojamą bakterinio kamieno tipą.

Toliau pateikiami tinkamų teigiamų kontrolinių medžiagų, naudojamų taikant metabolinę aktyvumą, 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
50-18-0		ciklofosfamidai
6055-19-2	200-015-4	ciklofosfamido monohidratas

Toliau pateikiama tinkama teigiama kontrolinė medžiaga, kai naudojamas redukcinės metabolinės aktyvacijos metodas:

CAS Nr.	Einecs Nr.	Medžiaga
573-58-0	209-358-4	Kongo raudonasis

2-aminoantracenas neturi būti naudojamas kaip vienintelis S9 mišinio efektyvumo indikatorius. Jei 2-aminoantracenas naudojamas, kiekviena S9 mišinio partija išanalizuojama, panaudojant mutageną, kuriam yra reikalinga metabolinė aktyvacija mikrosominių fermentų pagalba, pavyzdžiui, benzpireną ar dimetilbenzaantracenas.

Toliau pateikiami tinkamų teigiamų kontrolinių medžiagų, specifinių bakterijų kamienai, naudojamų netaikant egzogeninės metabolinės aktyvacijos, pavyzdžiai:

CAS Nr.	Einecs Nr.	Medžiaga	Kamienas
26628-22-8	247-852-1	Natrio azidas	TA 1535 ir TA 100
607-57-8	210-138-5	2-nitrofluorenas	TA 98
90-45-9	201-995-6	9-aminoakridinas	TA 1537, TA 97 ir TA 97a
17070-45-0	241-129-4	ICD 191	TA 1537, TA 97 ir TA 97a
80-15-9	201-254-7	kumeno hidroksiperoksidai	TA 102
50-07-7	200-008-6	mitomicinas C	WP2 uvrA ir TA102

CAS Nr.	Einecs Nr.	Medžiaga	Kamienas
70–25–7	200–730–1	N-etil-N-nitro-N-nitrozoguanidinas	WP2, WP2uvrA ir WP2uvrA(pK M101)
56–57–5	200–281–1	4-nitrokvinolino-1-oksidas	WP2, WP2uvrA ir WP2uvrA(pK M101)
3688–53–7		Furilfuramidas (AF2)	kamienai, turintys plazmidžių

Kitas atitinkamas etalonines medžiagas irgi galima naudoti kaip teigiamus kontrolinius mėginius. Jei įmanoma, apsvartomas su konkrečios klasės cheminėmis medžiagomis susijusių teigiamų kontrolinių mėginių naudojimas.

Taip pat turi būti neigiami kontroliniai mėginiai, sudaryti vien tik iš tirpiklio ar nešiklio, be bandomosios medžiagos, su kuriais visais kitais atžvilgiais elgiamasi taip pat kaip su bandomaisiais mėginiais. Be to, reikia naudoti nepaveiktus kontrolinius mėginius, nebent yra ankstesnių duomenų, rodančių, kad pasirinktas tirpiklis nėra nei žalingas, nei mutageniškas.

### 1.5.3. Bandymo eiga

Atliekant bandymą pagal inkorporacijos į lėkštelę metodą (1)(2)(3)(4), kai netaikoma metabolinė aktyvacija, paprastai 2 ml padengiančiojo agarų sumaišoma su 0,05 ml arba 0,1 ml bandomosios medžiagos tirpalo, 0,1 ml šviežiai išaugintos bakterijų kultūros (turinčios apie  $10^8$  gyvų ląstelių) ir 0,5 ml sterilaus buferio. Atliekant bandymą kai naudojama metabolinė aktyvacija, paprastai 0,5 ml metabolinės aktyvacijos mišinio, kuriame yra pakankamas post-mitochondrinės frakcijos kiekis (intervalo 5–30 % v/v ribose, metabolinės aktyvacijos mišinyje), sumaišoma su 2 ml padengiančiojo agarų, bakterijomis ir bandomąja medžiaga/bandomuoju tirpalu. Kiekvieno mėgintuvėlio turinys suplakamas ir užpilamas ant minimalaus agarų, esančio lėkštelėje, paviršiaus. Prieš inkubaciją padengiančiajam agarui leidžiama sukietėti.

Atliekant bandymą pagal išankstinės inkubacijos metodą (2)(3)(5)(6), bandomoji medžiaga/bandomasis tirpalas iš anksto inkubuojamas su bandomuoju bakteriniu kamieniu (turinčiu apie  $10^8$  gyvų ląstelių) ir steriliu buferiu arba metabolinės aktyvacijos sistema (0,5 ml) ir paprastai inkubuojamas 20 ar daugiau minučių 30–37 °C temperatūroje prieš sumaišant su padengiančiuoju agaru ir užpilant ant minimalaus agarų, esančio lėkštelėje, paviršiaus. Įprastiniu atveju 2 ml padengiančiojo agarų sumaišoma su 0,05 ar 0,1 ml bandomosios medžiagos/bandomojo tirpalo, 0,1 ml bakterijų ir 0,5 ml S9 mišinio ar sterilaus buferio. Atliekant išankstinę inkubaciją, mėgintuvėliai purtomi purtykle, kad jų turinys prisotintų 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 mokslškai pagrindžiamas. Kartais pasitaikantis lėkštelės praradimas nebūtinai reiškia, kad bandymas nepavyko.

Dujinės bei lakios medžiagos turi būti bandomos atitinkamais metodais, jas laikant sandariuose induose (12)(14)(15)(16).

### 1.5.4. Inkubacija

Per kiekvieną bandymą visos lėkštelės turi būti inkubuojamos 48–72 valandas 37 °C temperatūroje. Po inkubacijos nustatomas revertantų kolonijų, esančių kiekvienoje lėkštelėje skaičius.

## 2. DUOMENYS

### 2.1. REZULTATŲ APDOROJIMAS

Pateikiant rezultatus, nurodomas revertantų kolonijų, esančių vienoje lėkštelėje, skaičius. Taip pat reikia nurodyti revertantų kolonijų, esančių tiek teigiamose, tiek ir neigiamose (tirpiklio kontrolinis mėginys ir bandomąja medžiaga neveiktas kontrolinis mėginys) kontrolinėse lėkštelėse, skaičių. Pateikiant duomenis apie bandomąją medžiagą ir teigiamus bei neigiamus (tirpiklio kontrolinis mėginys ir (ar) bandomąja medžiaga neveiktas kontrolinis mėginys) kontrolinius mėginius, nurodomas revertantų kolonijų, esančių kiekvienoje lėkštelėje, skaičius, jo vidurkis bei standartinis nukrypimas.

Kai gaunamas aiškus teigiamas rezultatas, jo nereikia patvirtinti. Abejotini rezultatai išaiškunami tęsiant bandymus, geriausia šiek tiek pakeistomis eksperimentinėmis sąlygomis. Neigiami rezultatai patvirtinami kiekvienu atskiru atveju. Tais atvejais, kai manoma, jog nebūtina patvirtinti, kad buvo gauti neigiami rezultatai, šitai turi būti pagrįsta. Atliekant tolimesnius eksperimentus apsvartoma, ar reikia modifikuoti tiriamus parametrus tam,

kad būtų išplėstas įvertinamų sąlygų intervalas. Tiriamieji parametrai, kuriuos galima modifikuoti, yra ribos, skiriančios koncentracijas, bandymo atlikimo metodai (inkorporacijos į lėkštelę bei išankstinės inkubacijos) bei metabolinės aktyvacijos sąlygos.

## 2.2. REZULTATŲ ĮVERTINIMAS IR AIŠKINIMAS

Egzistuoja keletas teigiamo rezultato įvertinimo kriterijų, tokių kaip su koncentracija susijęs mažiausiai vieno kamieno revertantų kolonijų, esančių vienoje lėkštelėje, skaičiaus padidėjimas virš tiramos ribos, kai naudojama arba nenaudojama metabolinės aktyvacijos sistema ir/ar jį atkartojant, kai naudojama viena ar daugiau koncentracijų (23). Pirmiausia reikia aptarti biologinę rezultatų reikšmę. Įvertinant bandymo rezultatus, galima pasinaudoti statistiniais metodais (24). Tačiau statistinė svarba neturėtų tapti vieninteliu faktoriumi, apsprendžiančiu teigiamą atsaką.

Jei tiriant medžiagą gaunami rezultatai, neatitinkantys aukščiau minėtų kriterijų, tai medžiaga laikoma nemutageniška.

Nors daugumos eksperimentų metu gaunami aiškiai teigiami arba neigiami rezultatai, tačiau išimtiniais atvejais, remiantis visais gautais rezultatais, negalima padaryti tinkamos išvados apie bandomos medžiagos aktyvumą. Rezultatai gali likti abejotini ir neaiškūs, nepriklausomai nuo to, kiek kartų eksperimentas buvo pakartotas.

Jei tiriant bakterijų grįžtamąsias mutacijas gautas teigiamas rezultatas, tai reiškia, kad bandomoji medžiaga sukelia taškines mutacijas (bazių pakaitas arba skaitymo rėmelio pasislinkimą) *Salmonella typhimurium* ir (arba) *Escherichia coli* genome. Neigiami rezultatai rodo, kad tokiomis bandymo sąlygomis bandomoji medžiaga nesukelia mutacijų bandomose bakterijų rūšyse.

## 3. ATASKAITA

### BANDYMO ATASKAITA

Bandymo ataskaitoje turi būti pateikiama tokia informacija:

Tirpiklis/nešiklis:

- priešastys, dėl kurių buvo pasirinktas šis nešiklis,
- bandomosios cheminės medžiagos, esančios tirpiklyje/nešiklyje, tirpumas ir stabilumas, jei žinomas.

Kamienai:

- panaudoti kamienai,
- ląstelių, esančių vienoje kultūroje, skaičius,
- kamieno charakteristikos.

Bandymo sąlygos:

- bandomosios medžiagos kiekis vienoje lėkštelėje (mg/lėkštelėje arba µl/lėkštelėje), nurodant pagrindinę priežastį dėl kurios tiriant vieną koncentraciją, buvo pasirinkta konkreči dozė bei lėkštelių skaičius,
- panaudota terpė,
- metabolinės aktyvacijos sistemos tipas ir sudėtis, įskaitant ir sistemos tinkamumo kriterijus,
- poveikio bandomąja medžiaga atlikimo metodiką.

Rezultatai:

- toksiškumo požymiai,
- precipitacijos požymiai,
- kolonijų vienoje lėkštelėje skaičius,
- revertantų kolonijų vienoje lėkštelėje skaičiaus vidurkis bei standartinis nukrypimas,
- dozės ir atsako tarpusavio ryšys, jei jį įmanoma nurodyti,
- statistinės analizės, jei atliktos,
- kartu naudotų neigiamų (tirpiklis/nešiklis) ir teigiamų kontrolinių mėginių tyrimo duomenys, nurodant intervalus, vidurkius bei standartinius nukrypimus,
- anksčiau gauti neigiamų (tirpiklis/nešiklis) ir teigiamų kontrolinių mėginių tyrimo duomenys, nurodant intervalus, vidurkius bei standartinius nukrypimus.

Rezultatų aptarimas.

Išvados.

#### 4. NUORODOS

- 1) Ames, B.N., McCann, J. and Yamasaki E. (1975). Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian-Microsome Mutagenicity Test. *Mutation Res.*, 31, p. 347–364.
- 2) Maron, D.M. and Ames, B.N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. *Mutation Res.*, 113, p. 173–215.
- 3) Gatehouse, D., Haworth, S., Cebula, T., Gocke, E., Kier, L., Matsushima, T., Melcion, C., Nohmi, T., Venitt, S. and Zeiger, E. (1994). Recommendations for the Performance of Bacterial Mutation Assays. *Mutation Res.*, 312, p. 217–233.
- 4) Kier, L.D., Brusick D.J., Auletta, A.E., Von Halle, E.S., Brown, M.M., Simmon, V.F., Dunkel, V., McCann, J., Mortelmans, K., Prival, M., Rao, T.K. and Ray V. (1986). The *Salmonella typhimurium*/Mammalian Microsomal Assay: A Report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutation Res.*, 168, p. 69–240.
- 5) Yahagi, T., Degawa, M., Seino, Y.Y., Matsushima, T., Nagao, M., Sugimura, T. and Hashimoto, Y. (1975). Mutagenicity of Carcinogen Azo Dyes and their Derivatives, *Cancer Letters*, 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.
- 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.
- 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.15. MUTAGENIŠKUMO BANDYMAS IR ATRANKA PAGAL KANCEROGENIŠKUMĄ. SACCAROMYCES CEREVISIAE GENŲ MUTACIJOS****1. METODAS****1.1. ĮVADAS**

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

**1.2. APIBRĖŽTYS**

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

**1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS**

Nėra.

**1.4. BANDYMO METODO PRINCIPAS**

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

Haploidiniuose kamienuose gali būti naudojamos tiesioginės mutacinės sistemos, tokios kaip mutacinis virsmas iš raudonos spalvos mutantų, kurių augimui reikalingas adeninas (*ade-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 bandymo sistemą sudaro haploidinis kamienas XV 185–14C, kuris turi geno, koduojančio ochros spalvą, beprasmes mutacijas *ade 2-1*, *org 4-17*, *lys 1-1*, *trp 5-48*, kurios tampa grįžtamosiomis mutacijomis atlikus bazių pakeitimą mutagenais, sukeliančiais vietos atžvilgiu specifines mutacijas arba geno, koduojančio ochros spalvą, veiklą slopinančias mutacijas. Kamienas XV 185–14C taip pat turi žymę *his 1-7* –beprasmę mutaciją, kuri gali virsti grįžtamąja mutacija, įvykus mutacijai antroje vietoje, bei žymę *hom 3-10*, kuri tampa grįžtamąja mutacija paveikus ją mutagenais, sukeliančiais skaitymo rėmelio pasislinkimą.

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

**1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI**

Nėra.

**1.6. BANDYMO METODO APIBŪDINIMAS**

*Pasiruošimas bandymui*

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

*Metabolitinė aktyvacija*

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

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

Bandymo sąlygos

Bandomieji kamienai

Atliekant genų mutacijų bandymus labiausiai yra naudojami haploidinis kamienas XV 185–14C ir diploidinis kamienas D<sub>7</sub>. 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 bandomąją medžiagą ir tirpiklio kontroles. Nustatant kiekvieną specifinę galutinę mutaciją, naudojamos atitinkamos teigiamos kontrolės.

Veikimo koncentracija

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

Inkubacijos sąlygos

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

Spontaninių mutacijų dažniai

Reikėtų naudoti subkultūras, kuriose spontaninių mutacijų dažniai yra normalūs.

Tikslių kopijų skaičius

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

Bandymo eiga

*S. cerevisiae* kamienai paprastai veikiami bandomąja medžiaga, ląstelėms esant stacionarinėje arba augimo stadijoje skystoje terpėje. Iš pradžių eksperimentai atliekami su ląstelėmis, esančiomis augimo stadijoje; 1–5 × 10 ląstelių/ml veikiamos bandomąja medžiaga 18 valandų 28–37 °C temperatūroje ant kratyklės; jeigu reikia, veikimo metu į terpę įnešamas atitinkamas 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. BANDYMO ATASKAITA

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

- panaudotas kamienas,
- bandymo sąlygos: ląstelių stacionarioji ar augimo fazė, terpės sudėtis, inkubacijos temperatūra ir trukmė, metabolitinės aktyvacijos sistema,
- veikimo sąlygos: veikimo laipsnis, veikimo procedūra ir trukmė, veikimo temperatūra, teigiamos ir neigiamos kontrolės,
- kolonijų skaičius, kolonijų, kuriose neįvyko ir įvyko mutacijos bei mutacijos dažnis, dozės ir atsako sąsaja, jei įmanoma nurodyti, statistinis duomenų įvertinimas,
- rezultatų aptarimas,
- rezultatų aiškinimas.

#### 3.2. ĮVERTINIMAS IR AIŠKINIMAS

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

### 4. NUORODOS

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

## B.16. MITOZINĖ REKOMBINACIJA – SACCHAROMYCES CEREVISIAE

## 1. METODAS

## 1.1. ĮVADAS

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

## 1.2. APIBRĖŽTYS

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

## 1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Nėra.

## 1.4. BANDYMO METODO PRINCIPAS

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

## 1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

Nėra.

## 1.6. BANDYMO METODO APIBŪDINIMAS

*Pasiruošimas bandymui*

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

*Metabolinė aktyvacija*

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

*Bandymo sąlygos**Bandomieji kamienai*

Dažniausiai naudojami diploidiniai D<sub>4</sub>, D<sub>5</sub>, D<sub>7</sub> ir JD1. Galima naudoti ir kitus kamienus.

### Terpė

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

### Teigiamos ir neigiamos kontrolės

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

### Veikimo koncentracijos

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

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

### Inkubacijos sąlygos

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

### Spontaninės mitozinės rekombinacijos dažniai

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

### Tikslių kopijų skaičius

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

### Bandymo eiga

*S. cerevisiae* kamienai paprastai veikiama bandomąja 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 veikiama bandomąja medžiaga 18 valandų 28–37 °C temperatūroje ant kratyklės; jeigu reikia, tai 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 mitozinė rekombinacija, skaičius.

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

## 2. DUOMENYS

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

Visi rezultatai turėtų būti patvirtinti atlikus nepriklausomą bandymą.

Duomenis reikėtų įvertinti atitinkamais statistiniais metodais.

### 3. ATASKAITA

#### 3.1. BANDYMO ATASKAITA

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

- panaudotas kamienas,
- bandymo sąlygos: ląstelių stacionarioji ar augimo fazė, terpės sudėtis, inkubacijos temperatūra ir trukmė, metabolitinės aktyvacijos sistema,
- veikimo sąlygos: veikimo laipsnis, veikimo procedūra ir trukmė, veikimo temperatūra, teigiamos ir neigiamos kontrolės,
- kolonijų skaičius, kolonijų, kuriose neįvyko ir įvyko rekombinacijos bei rekombinacijos dažnis, dozės ir atsako sąsaja, jei įmanoma nurodyti, statistinis duomenų įvertinimas,
- rezultatų aptarimas,
- rezultatų aiškinimas.

#### 3.2. ĮVERTINIMAS IR AIŠKINIMAS

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

### 4. NUORODOS

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

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

## 1. METODAS

Šis metodas atitinka OECD TG 476 – Žinduolių ląstelių genų mutacijų bandymą *in vitro* (1997).

## 1.1. ĮVADAS

Žinduolių ląstelių genų mutacijų bandymas *in vitro* gali būti naudojamas siekiant aptikti cheminių medžiagų sukeltas mutacijas. Tinkamoms ląstelių linijoms priklauso pelių limfomos ląstelių linija L5178Y, kuniškojo žiurkėno ląstelių linijos CHO, CHO-ASS2 bei V79 ir žmogaus limfoblastų linija TK (1). Naudojant šias linijas, dažniausiai įvertinamos timidinkinazę (TK) bei hipoksantinguaninfosforiboziltransferazę (HFRT) koduojančių genų bei ksantinguaninfosforiboziltransferazę (KFRT) koduojančio transgeno mutacijos. Atliekant TK, KFRT bei HFRT koduojančių genų mutacijų bandymus, nustatomi ir skirtingi genetinių įvykių spektrai. Dėl to, kad TK ir KFRT koduojantys genai yra lokalizuoti autosominėse chromosomose, galima nustatyti genetinius įvykius (pavyzdžiui, didelių genų segmentų delecijas), kurie nėra nustatomi HFRT koduojančio geno, esančio X chromosomose, lokuse (2) (3) (4) (5) (6).

Atliekant žinduolių ląstelių genų mutacijų bandymą *in vitro*, galima naudoti gerai žinomas ląstelių linijas ar kamienus. Bandymo metu naudojamos ląstelės atrenkamos pagal sugebėjimą augti kultūroje bei stabilumą spontaniškai vykstančių mutacijų atžvilgiu.

Bendru atveju, kai bandymai atliekami *in vitro*, reikia naudoti egzogeninį metabolinės aktyvacijos šaltinį. Ši metabolinė aktyvacijos sistema negali absoliučiai atitikti žinduolių sąlygų *in vivo*. Reikia stengtis vengti tokių sąlygų, kurioms esant bus gaunami rezultatai, neatspindintys vidinio mutageniškumo. Teigiami rezultatai, neatspindintys vidinio mutageniškumo, gali būti gaunami dėl pH ir osmosinio slėgio pokyčių bei didelio citotoksiškumo laipsnio (7).

Šis bandymas naudojamas atrinkti galimus žinduolių mutagenus bei kancerogenus. Daugelis junginių, kurie šio bandymo metu pasirodo esą teigiami, yra žinduolių kancerogenai, tačiau nėra aiškaus tarpusavio ryšio tarp šio bandymo ir kancerogeniškumo. Tarpusavio ryšys priklauso nuo cheminių medžiagų klasės ir vis daugėja įrodymų, kad šio bandymo metu negalima nustatyti kai kurių kancerogenų, galbūt dėl to, kad jie nepasižymi genotoksiškumu arba bakterinėse ląstelėse veikia visiškai kitaip (6).

Taip pat žr. Bendrojo įvado B dalį.

## 1.2. APIBRĖŽTYS

**Tiesioginės mutacijos** – geno tėvinio tipo mutantinės formos mutacija, dėl kurios šio geno koduojamas baltymas praranda fermentinį aktyvumą arba šis pakinta.

**Bazių porų pakaitas sukiantys mutagenai** – medžiagos, sukeliančios vienos ar kelių bazių porų, esančių DNR molekulėje, pakaitas.

**Skaitymo rėmelio poslinkį sukiantys mutagenai** – medžiagos, sukeliančios vienos ar daugelio bazių porų tarpusavio ar iškritas.

**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 bandomąja medžiaga, kloninio augimo efektyvumas tuo metu, kai, pasibaigus ekspresijai, jos pasėjamos į terpę, esant sąlygoms, naudojamoms atrankai.

**Išgyvenimas** – ląstelių, paveiktų bandomąja medžiaga, kloninio augimo efektyvumas tuo metu, kai baigiantis veikimui bandomąja medžiaga, jos pasėjamos į terpę; bendru atveju išgyvenimas lyginamas su kontrolinės ląstelių populiacijos išgyvenimu.

### 1.3. BANDYMO METODO PRINCIPAS

Ląstelės, nesugebančios sintetinti timidinkinazės (TK) dėl mutacijos TK<sup>+/</sup> -> TK<sup>-</sup>, yra atsparios pirimidino analogo – trifluortimidino (TFT) – sukeliamiems citotoksiniams poveikiams. Ląstelės, sugebančios sintetinti TK, yra jautrios TFT, kuris blokuoja ląstelės metabolizmą bei sustabdo tolimesnį jos dalijimąsi. Taigi mutantinės ląstelės sugeba proliferuoti, esant terpėje TFT, kai tuo tarpu normalios ląstelės, sintetinančios TK, šito padaryti negali. Ląstelės nesugebančios sintetinti HFRT ir KFRT yra panašiai atrankamos pagal atsparumą 6-tioguaninui (TG) arba 8-azaguaninui (AG). Jeigu žinduolių genų mutacijos yra bandomos, panaudojant medžiagą, kuri yra naudojama ląstelių atrankai ir yra bazių analogas arba cheminis junginys, tai reikia ypač atkreipti dėmesį į bandomosios cheminės medžiagos savybes. Pavyzdžiui, reikia tirti bet kokią įtarimą keliantį bandomosios medžiagos toksiškumą pagal santykinį kloninio augimo efektyvumą ar absoliutų santykinį kultūros augimą, matuojamą tada, kai baigiasi ląstelių veikimas bandomąja medžiaga. Kultūros, paveiktos bandomąja medžiaga, palaikomos terpėje tam tikrą laiką, būdingą kiekvienam lokusui bei ląstelių tipui tam, kad vyktų beveik optimali atsiradusių mutacijų fenotipo ekspresija. Mutavimo dažnis nustatomas, pasėjant žinomą ląstelių skaičių į terpę, turinčią atrankai naudojamą medžiagą tam, kad, siekiant įvertinti kloninio augimo efektyvumą, būtų identifiкуotos mutantinės ląstelės, esančios terpėje, neturinčioje atrankai naudojamą medžiagą. Pasibaigus inkubacijai, suskaičiuojamos kolonijos. Mutavimo dažnis nustatomas, suskaičiuojant kolonijas, kuriose įvyko mutacijos ir kurios buvo auginamos terpėje, turinčioje arba neturinčioje atrankai naudojamą medžiagą.

Ląstelės, esančios suspensijoje arba vienasluoksnėje kultūroje, veikiamos bandomąja medžiaga, esant arba nesant metabolinės aktyvacijos sistemos ir prieš pradėdant bandymą šiek tiek pakultivuojamos tam, kad būtų nustatytas citotoksiškumas bei vyktų fenotipo ekspresija (9) (10) (11) (12) (13). Įprastiniu atveju citotoksiškumas nustatomas pagal santykinį kloninio augimo efektyvumą ar absoliutų santykinį kultūros augimą, matuojamą tada, kai baigiasi ląstelių veikimas bandomąja medžiaga. Kultūros, paveiktos bandomąja medžiaga, palaikomos terpėje tam tikrą laiką, būdingą kiekvienam lokusui bei ląstelių tipui tam, kad vyktų beveik optimali atsiradusių mutacijų fenotipo ekspresija. Mutavimo dažnis nustatomas, pasėjant žinomą ląstelių skaičių į terpę, turinčią atrankai naudojamą medžiagą tam, kad, siekiant įvertinti kloninio augimo efektyvumą, būtų identifiкуotos mutantinės ląstelės, esančios terpėje, neturinčioje atrankai naudojamą medžiagą. Pasibaigus inkubacijai, suskaičiuojamos kolonijos. Mutavimo dažnis nustatomas, suskaičiuojant kolonijas, kuriose įvyko mutacijos ir kurios buvo auginamos terpėje, turinčioje arba neturinčioje atrankai naudojamą medžiagą.

### 1.4. BANDYMO METODO APRASŲYMAS

#### 1.4.1. **Preparatai**

##### 1.4.1.1. *Ląstelės*

Šio bandymo metu galima naudoti įvairius ląstelių tipus, įskaitant L5171Y, CHO, CHO-AS52, V79 klonus arba TK6 ląsteles. Bandymo metu naudojami ląstelių tipai turi būti jautrūs cheminiams mutagenams, jų kloninio augimo efektyvumas turi būti pakankamai didelis bei jose vykstančių spontanių mutacijų dažnis turi būti pakankamai stabilus. Ląstelės turi būti patikrintos, ar neužkrėstos mikoplazmomis, nes priešingu atveju, atliekant šį bandymą, jos nėra naudojamos.

Bandymas parengiamas taip, kad jis būtų atliekamas, esant kuo didesniai nustatymo jautrumui bei visapusiškumui. Naudojamų ląstelių bei jų kultūrų skaičius ir bandomosios medžiagos koncentracijos turi atspindėti šiuos apibrėžtus parametrus (14). Minimalus, gyvų ląstelių, išlikusių po veikimo bandomąja medžiaga bei naudojamų kiekviename bandymo etape, skaičius turi būti pagrįstas spontanių mutacijų dažniu. Rekomenduojama panaudoti mažiausiai 10<sup>6</sup> ląstelių. Turi būti sudaryta galimybė susipažinti su anksčiau gautais duomenimis apie ląstelinę sistemą, rodančiais, kad bandymas atliekamas nuosekliai.

##### 1.4.1.2. *Terpė ir kultivavimo sąlygos*

Reikia naudoti atitinkamą terpę, skirtą kultivavimui bei laikyti atitinkamų inkubavimo sąlygų (kultivavimo indai, temperatūra, CO<sub>2</sub> koncentracija ir drėgmė). Terpė turi būti parinkta atsižvelgiant į šio bandymo metu naudojamas atrankos sistemas bei ląstelių tipą. Ypač svarbu tai, kad pasirinktos kultivavimo sąlygos užtikrintų optimalų ląstelių augimą ekspresijos metu bei normalių ir mutantinių ląstelių sugebėjimą suformuoti kolonijas.

##### 1.4.1.3. *Kultūrų paruošimas*

Ląstelės padauginamos iš kamieninių kultūrų, pasėjamos į terpę, skirtą kultivavimui ir inkubuojamos 37 °C temperatūroje. Prieš pradėdant šį bandymą, kultūros turi būti išgryninamos, kad būtų atsikratyta jau anksčiau esančių mutantinių ląstelių.

##### 1.4.1.4. *Metabolinė aktyvacija*

Ląstelės inkubuojamos su bandomąja chemine medžiaga, tiek esant, tiek ir nesant atitinkamos metabolinės aktyvacijos sistemos. Plačiausiai vartojama sistema yra post-mitochondrinė frakcija, išskirta iš graužikų kepenų, paveiktų tokiomis fermentinių aktyvumą skatinančiomis medžiagomis kaip AROCLOR 1254 (15) (16) (17) (18) ar fenobarbitono ir β-naftoflavono mišiniu (19) (20) bei praturtinta kofaktoriumi.

Post-mitochondrinė frakcija paprastai vartojama koncentracijomis, kurių intervalas bandymo metu naudojamoje galutinėje terpėje siekia nuo 1–10 % (v/v). Metabolinės aktyvacijos sistema pasirenkama priklausomai nuo bandomosios cheminės medžiagos klasės. Kai kuriais atvejais tikslinga vartoti daugiau nei post-mitochondrinės frakcijos koncentraciją.

Endogeninę aktyvaciją gali pagerinti daug tuo tikslu padarytų pasiekimų, įskaitant ir genetinės inžinerijos pagalba gautas ląstelių linijas, kurios gamina specifinius fermentus, dalyvaujančius aktyvacijoje. Bandyme naudojamos ląstelių linijos pasirenkamos moksliskai pagrįstai (pavyzdžiui pagal citochromo P450 izofermento svarbą bandomos cheminės medžiagos metabolizmui).

#### 1.4.1.5. *Bandomosios medžiagos/paruošimas*

Kietosios bandomosios medžiagos turi būti ištirpinamos arba suspenduojamos atitinkamuose tirpikliuose arba nešikliuose ir, jeigu reikia, tai prieš tai, kai šia medžiaga bus paveiktos ląstelės, jos yra praskiedžiamos. Prieš paveikiant ląsteles skystosiomis bandomosiomis medžiagomis arba po veikimo, šios medžiagos gali būti tiesiogiai įnešamos į bandomąsias sistemas ir praskiedžiamos. Bandomosios medžiagos preparatai gaminami prieš kiekvieną bandymą, neatsižvelgiant į tai, kad šių medžiagų stabilumo bandymo duomenys tenkina saugojimo sąlygas.

#### 1.4.2. **Bandymo sąlygos**

##### 1.4.2.1. *Tirpiklis/nešiklis*

Tikimasi, kad tirpiklis/nešiklis chemiškai nereaguos su bandomąja chemine medžiaga ir atitiks ląstelių išgyvenimą bei S9 aktyvumą. Jeigu naudojami kiti, skirtingai nei žinomi, tirpikliai/nešikliai, tai prieš pradėdant juos vartoti, reikia pateikti jų tinkamumą įrodančius duomenis. Jei yra įmanoma, tai pirmiausia rekomenduojama naudoti skystosios fazės tirpiklį arba nešiklį. Kai bandomos vandenyje netirpios cheminės medžiagos, tai naudojamuose organiniuose tirpikliuose neturi būti vandens. Vandenį galima pašalinti, papildomai naudojant molekulinį filtrą.

##### 1.4.2.2. *Veikimo koncentracijos*

Kai parenkama pati didžiausia koncentracija, tai vadovujamasi tokiais kriterijais kaip citotoksiškumas, tirpumas bandomojoje sistemoje ir pH arba osmosinio slėgio pokyčiai.

Citotoksiškumas turi būti nustatomas pagrindinio eksperimento, naudojant arba nenaudojant metabolinės aktyvacijos sistemos, metu, remiantis atitinkamais rodikliais, rodančiais, kad ląstelės yra vientisos ir kad jos auga – santykinu kloninio augimo efektyvumu arba absoliučiu santykinu augimu. Būtų naudinga citotoksiškumą bei tirpumą nustatyti išankstinio eksperimento metu.

Turi būti naudojamos bent 4 išbandomos koncentracijos. Jei citotoksiškumas pasireiškia, tai šios koncentracijos turėtų svyruoti nuo maksimalaus iki minimalaus citotoksiškumo laipsnio arba jo apskritai neturėtų būti; šitai paprastai reikš, kad koncentracijos turės būti atskirtos tikta faktoriumi, esančiu tarp 2 ir  $\sqrt{10}$ . Jei didžiausia koncentracija yra pagrįsta citotoksiškumu, tai esant jai, santykinis išgyvenimas arba santykinis absoliutus augimas turi sudaryti apie 10–20 % (bet ne mažiau kaip 10 %). Santykinai necitotoksiškų medžiagų atveju maksimali bandomoji koncentracija turi būti 5 mg/ml, 5  $\mu$ l/ml arba 0,01 M, bet kuriai esant mažiausiai.

Santykinai netirpios medžiagos turi būti bandomos kultivavimo sąlygomis, jų tirpumui siekiant ribą arba esant už jos. Netirpumas turi būti nustatomas galutinėje terpėje, kuria paveikiamos ląstelės. Prieš pradėdant ir baigiant veikimą bandomąja medžiaga, būtų naudinga nustatyti tirpumą, kadangi veikimo metu tirpumas gali pakisti dėl bandomojoje sistemoje esančių ląstelių, S9 mišinio, serumo ir pan. netirpumą galima įvertinti plika akimi. Precipitatas neturi trukdyti rezultatų vertinimui.

##### 1.4.2.3. *Kontroliniai mėginiai*

Atliekant kiekvieną eksperimentą, vienu metu reikia naudoti teigiamus ir neigiamus (tirpiklis/nešiklis) kontrolinius mėginius, esant arba nesant metabolinės aktyvacijos sistemos. Kai naudojama metabolinė aktyvacija, tai teigiamas kontrolinis mėginys turi būti cheminė medžiaga, kuria reikia aktyvuoti tam, kad ši sukeltų mutageninį atsaką.

Teigiamų kontrolinių medžiagų pavyzdžiai:

Metabolinės aktyvacijos sąlygos	Lokusas	Medžiaga	CAS Nr.	Einecs Nr.	
Egzogeninės metabolinės aktyvacijos nėra	HPRT	Etilmetansulfonatas	62-50-0	200-536-7	
		Etilnitrozošlapalas	759-73-9	212-072-2	
	TK (mažos ir didelės kolonijos)	Metilmetansulfonatas	66-27-3	200-625-0	
		XPRT	Etilmetansulfonatas	62-50-0	200-536-7
			Etilnitrozošlapalas	759-73-9	212-072-2
Egzogeninė metabolinė aktyvacijos sistema yra	HPRT	3-Metilcholantrenas	56-49-5	200-276-4	
		N-nitrozodietilaminas	62-75-9	200-549-8	
		7,12-Dimetilbenzantracenas	57-97-6	200-359-5	
	TK (mažos ir didelės kolonijos)	Ciklofosfamidai	50-18-0	200-015-4	
		Ciklofosfamidmonohidratas	6055-19-2		
		Benzpirenas	50-32-8	200-028-5	
	XPRT	N-nitrozodimetilaminas (esant dideliems S9 mišinio kiekiams)	62-75-9	200-549-8	
		Benzpirenas	50-32-8	200-028-5	

Galima naudoti ir kitas teigiamas kontrolines etalonines medžiagas, pavyzdžiui, jei laboratorijoje buvo anksčiau gauti duomenys apie 5-bromo-2'-deoksirididną (CAS Nr. 59-14-3; Einecs Nr. 200-415-9), tai galima naudoti šią etaloninę medžiagą. Kai yra įmanoma, tai reikia apsarstyti konkrečios klasės cheminių medžiagų, kaip teigiamų kontrolinių mėginių, panaudojimą.

Reikia panaudoti ir neigiamus kontrolinius mėginius, sudarytus vien tik iš tirpiklio ar nešiklio ir neturinčius bandomosios medžiagos bei paveiktus tokiu pat būdu kaip ir bandomieji mėginiai. Be to, reikia naudoti ir bandomąją medžiagą neveiktus neigiamus kontrolinius mėginius, nekreipiant dėmesio į anksčiau gautus kontrolinius duomenis, rodančius, kad pasirinktas tirpiklis nėra žalingas ir mutageniškas.

### 1.4.3. Bandyto atlikimo metodika

#### 1.4.3.1. Veikimas bandomąja medžiaga

Proliferuojančios ląstelės paveikiamos bandomąja medžiaga, tiek esant tiek ir nesant metabolinės aktyvacijos. Poveikis turi trukti atitinkamą laiką (efektyvus poveikis paprastai užtrunka 3–6 valandas). Poveikio trukmė gali būti prailginama vienu ar keliais ląstelės ciklais.

Tiriant kiekvieną koncentraciją gali būti atliekami kultūrų, paveiktų bandomąja medžiaga, 1 ar 2 pakartojimai. Kai atliekamas kultūrų, paveiktų bandomąja medžiaga, vienetinis pakartojimas, tai koncentracijų skaičius padidinamas, kad užtikrinti, jog susidarys pakankamas analizuojamų kultūrų skaičius (turi būti naudojamos mažiausiai 8 bandomosios koncentracijos). Reikia mažiausiai dukart panaudoti neigiamas (tirpikliu paveiktas) kontrolines kultūras.

Dujinės ir lakios medžiagos turi būti bandomos atitinkamais metodais, panaudojant užsandarintus indus (21), (22).



#### 1.4.3.2. Išgyvenimo, gyvybingumo bei mutavimo dažnio nustatymas

Baigiantis veikimui bandomąja medžiaga, ląstelės perplaunamos ir pakultivuojamos, siekiant nustatyti jų išgyvenimą bei užtikrinti mutantinio fenotipo ekspresiją. Pasibaigus veikimui bandomąja medžiaga, iškart nustatomas citotoksiškumas, įvertinant santykinį kloninio augimo efektyvumą (išgyvenimą) arba absoliutų santykinį augimą.

Kiekvienas lokusas turi apibrėžtą mažiausią laiko tarpą, per kurį turi įvykti beveik optimali naujai atsiradusio mutantinio fenotipų ekspresija (HFRT ir KFRT fenotipas turi mažiausiai ekspresuotis 6–8 dienas, o TK fenotipas – mažiausiai 2 dienas). Ląstelės auginamos terpėje, turinčioje arba neturinčioje medžiagos, kurios pagalba mutantai atrenkami pagal kloninio augimo efektyvumą bei nustatomas jų skaičius. Gyvybingumas pradedamas nustatinėti (tam, kad būtų galima apskaičiuoti mutavimo dažnį) baigiantis ekspresijai, kai kamienai pasėjami į lėkštelę su terpe, kuri nėra skirta atrankai (nes neturi atrankai naudojamos medžiagos).

Jei L5178Y TK<sup>+</sup>/– bandymo metu nustatoma, kad bandomoji medžiaga yra teigiama, tai mažiausiai vieną kartą nustatomas bandomųjų kultūrų (esant pačiai didžiausiai teigiamai koncentracijai) bei teigiamų ir neigiamų kontrolinių kultūrų dydis. Jei L5178Y TK<sup>+</sup>/– bandymo metu nustatoma, kad bandomoji yra neigiama, tai nustatomas teigiamų bei neigiamų kontrolinių kolonijų skaičius. Atliekant TK6TK<sup>+</sup>/– bandymą, taipogi galima įvertinti kolonijų dydį.

## 2. DUOMENYS

### 2.1. REZULTATŲ APDOROJIMAS

Pateikiant duomenis, turi būti nurodytas kontrolinių bei paveiktų bandomąja medžiaga kultūrų nustatytas citotoksiškumas, gyvybingumas, kolonijų skaičius bei mutavimo dažnis. Jei atliekant L5178Y TK<sup>+</sup>/– bandymą buvo gautas teigiamas atsakas, tai kolonijos vertinamos, panaudojant kriterijus, skirtus mažiausiai 1 bandomosios medžiagos koncentracijai, kuria buvo veikiamos mažos ir didelės kolonijos bei teigiamos ir neigiamos kontrolinės kolonijos. Didelėse bei mažose kolonijose esančių mutantų molekulinė ir citogenetinė prigimtis buvo išsamiai ištirta (23), (24). Atliekant TK<sup>+</sup>/– bandymą, kolonijos buvo vertinamos, panaudojant normalaus augimo (didelės kolonijos) ir sulėtinto augimo (mažos kolonijos) kriterijus (25). Mutantinės ląstelės, kuriose įvyko dideli genetiniai pažeidimai, pasižymi ilgesniu nei paprastai dalijimosi periodu ir todėl jos suformuoja mažas kolonijas. Šis sutrikimas įprastiniu atveju gali pasireikšti arba kaip atskiro geno praradimas arba kariotipiškai įvertinamomis chromosomų aberacijomis. Cheminės medžiagos, sukeliančios gigantinių chromosomų aberacijas, skatina mažas kolonijas sudarančių mutantų susiformavimą (26). Mažiau pažeistos mutantinės ląstelės auga panašiai kaip ir tėvinės ląstelės bei sudaro dideles kolonijas.

Reikia pateikti išgyvenimo (santykinio kloninio augimo efektyvumo) ar absoliutaus santykinio augimo duomenis. Mutavimo dažnis turi būti išreiškiamas kaip mutantinių ir išgyvenusių ląstelių skaičiaus santykis.

Kiekvienos kultūros bandymo duomenys pateikiami atskirai. Be to visi duomenys turi būti pateikiami apibendrintai, lentelių forma.

Nėra būtina patvirtinti, kad buvo gautas teigiamas atsakas. Abejotini rezultatai išaiškinami tęsiant bandymus, kurių metu pirmiausia pakeičiamos eksperimentinės sąlygos. Neigiami rezultatai patvirtinami kiekvienu atveju. Jei manoma, jog nėra reikalo patvirtinti, kad buvo gauti neigiami rezultatai, tai reikia pateikti pateisinančias aplinkybes. Vėliau atliekant eksperimentus, reikia apsvaistyti bandomų parametrų pakeitimus tam, kad, analizuojant abejotinus bei neigiamus rezultatus, būtų išplėstas įvertinamų sąlygų spektras. Koncentracijas skiriančiosios ribos bei metabolinės aktyvacijos sąlygos yra bandomieji parametrai, kuriuos galima modifikuoti.

### 2.2. REZULTATŲ ĮVERTINIMAS IR AIŠKINIMAS

Egzistuoja keli teigiamo rezultato įvertinimo kriterijai, tokie kaip nuo koncentracijos priklausantis arba atkartojamas mutavimo dažnio padidėjimas. Pirmiausia reikia aptarti biologinę rezultatų reikšmę. Įvertinant bandymo rezultatus, galima pasinaudoti statistiniais metodais. Tačiau statistikos svarba neturėtų tapti vieninteliu faktoriumi, apsprendžiančiu teigiamą atsaką.

Jei tiriant medžiagą, gaunami rezultatai, neatitinkantys aukščiau minėtų kriterijų, tai medžiaga laikoma nemutageniška.

Nors daugumos eksperimentų metu gaunami aiškiai teigiami arba neigiami rezultatai, tačiau išimtiniais atvejais, remiantis visais gautais rezultatais, negalima padaryti tinkamos išvados apie bandomos medžiagos aktyvumą. Rezultatai gali likti abejotini ir neaiškūs, nepriklausomai nuo to, kiek kartų eksperimentas buvo pakartotas.

Teigiami rezultatai, gauti, tiriant žinduolių ląstelių genų mutacijas, rodo, kad bandomoji medžiaga sukelia genų mutacijas panaudojant žinduolių ląstelėse. Nuo koncentracijos priklausantis teigiamas atsakas yra svarbiausias. Neigiami rezultatai rodo, kad, esant bandymo sąlygoms bandomoji medžiaga nesukelia genų mutacijų panaudojant žinduolių ląstelėse.

### 3. ATASKAITA

#### BANDYMO ATASKAITA

Bandymo ataskaitoje turi būti pateikiama tokia informacija:

Tirpiklis/nešiklis įrenginys:

- priešastys, dėl kurių buvo pasirinktas šis įrenginys,
- bandomosios cheminės medžiagos, esančios tirpiklyje/nešiklyje, tirpumas ir stabilumas, jei toks yra žinomas.

Ląstelės:

- ląstelių tipas ir šaltinis,
- ląstelių kultūrų skaičius,
- ląstelių persėjimų skaičius (jei jį galima nurodyti),
- ląstelių kultūros palaikymo metodai (jei juos galima nurodyti),
- ar neužsikrėtusios mikoplazmomis.

Bandymo sąlygos:

- pagrindinė priešastis, nulėmusi koncentracijų bei kultūrų skaičiaus pasirinkimą, įskaitant citotoksiškumo nustatymo duomenis bei tirpumo apribojimus (jei juos įmanoma nurodyti),
- terpės sudėtis ir CO<sub>2</sub> koncentracija,
- bandomosios medžiagos sudėtis,
- nešiklio darbinė talpa bei į jį įdėtos medžiagos tūris,
- inkubacijos temperatūra,
- inkubacijos trukmė,
- veikimo bandomąja medžiaga trukmė,
- ląstelių tankis veikimo metu,
- metabolinės aktyvacijos sistemos tipas bei sudėtis,
- teigiami bei neigiami kontroliniai mėginiai, įskaitant jų tinkamumo kriterijus,
- ekspresijos trukmė (įskaitant pasėtų ląstelių skaičių, subkultivavimo bei mitybai skirtų medžiagų įnešimo tvarkaraščiai, jei juos įmanoma pateikti),
- atrankos medžiagos,
- kriterijai, kuriais vadovaujamosi, sprendžiant, ar bandymų metu gauti rezultatai yra teigiami, neigiami ar abejotini,

- gyvų bei mutantinių ląstelių skaičiaus nustatymo metodai,
- kolonijų dydis ir tipas (įskaitant „mažų“ bei „didelių“ kolonijų vertinimo kriterijus, kaip yra numatyta).

Rezultatai:

- toksiškumo požymiai,
- precipitacijos požymiai,
- duomenys apie pH bei osmosinį slėgį, veikiant bandomąją medžiagą (jei tai buvo bandoma),
- kolonijų dydis, jei buvo vertinamos bent neigiamos arba teigiamos kontrolės,
- laboratorijos kompetentingumas L5178Y TK<sup>+</sup>/- sistemos pagalba nustatyti mutantus, sudarančius mažas kolonijas (jei tai būtina nurodyti),
- dozės ir atsako tarpusavio ryšys (jei įmanoma nurodyti),
- statistinės analizės (jei bet kokios buvo atliktos),
- duomenys apie vienu metu naudojamus neigiamus (tirpiklis/nešiklis) ir teigiamus kontrolinius mėginius,
- anksčiau gauti duomenys apie neigiamus (tirpiklis/nešiklis) bei teigiamus kontrolinius mėginius, kartu nurodant jų intervalus, vidurkius ir standartinius nukrypimus,
- mutavimo dažnis.

Rezultatų aptarimas.

Išvados.

#### 4. NUORODOS

- 1) Moore, M.M., DeMarini, D.M., DeSerres, F.J. and Tindall, K.R. (Eds.) (1987). Banbury Report 28: Mammalian Cell Mutagenesis, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- 2) Chu, E.H.Y. and Mailing, h.V. (1968). Mammalian Cell Genetics. II. Chemical Induction of Specific Locus Mutations in Chinese Hamster Cells *In Vitro*, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 61, p. 1306–1312.
- 3) Liber, h.L. and Thilly, W.G. (1982). Mutation Assay at the Thymidine Kinase Locus in Diploid Human Lymphoblasts. *Mutation Res.*, 94, p. 467–485.
- 4) Moore, M.M., Harington-Brock, K., Doerr, C.L. and Dearfield, K.L. (1989). Differential Mutant Quantitation at the Mouse Lymphoma TK and CHO HGPRT Loci. *Mutagenesis*, 4, p. 394–403.
- 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 Mavourmin, 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<sup>+/+</sup> – TK<sup>+/+</sup> 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.
- 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<sup>+/+</sup> 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<sup>+/-</sup> 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<sup>+/-</sup> - 3.7.2C Mouse Lymphoma Cells. *Mutagenesis*, 5, p. 609–614.

**B.18. DNR PAŽAIDOS IR JŲ REPARACIJA – NETAISYKLINGA DNR SINTEZĖ – ŽINDUOLIŲ LĄSTELĖSE IN VITRO****1. METODAS****1.1. ĮVADAS**

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

**1.2. APIBRĖŽTYS**

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

**1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS**

Nėra.

**1.4. BANDYMO METODO PRINCIPAS**

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

**1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI**

Nėra.

**1.6. BANDYMO METODO APIBŪDINIMAS***Pasiruošimas bandymui*

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

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

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

*Bandymo sąlygos**Kultūrų skaičius*

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

*Teigiamos ir neigiamos kontrolės*

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

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

#### Veikimo koncentracijos

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

#### Ląstelės

Kultivuojant kultūras reikėtų naudoti atitinkamą terpę ir laikytis atitinkamos CO<sub>2</sub> koncentracijos, temperatūros bei drėgmės. Reikėtų periodiškai tikrinti gerai žinomas ląstelių linijas, siekiant nustatyti mikoplazmų sukeltą infekciją.

#### Metabolinė aktyvacija

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

#### Bandymo eiga

#### Kultūrų paruošimas

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

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

Žmogaus limfocitų kultūros paruošiamos atitinkamais metodais.

#### Kultūrų veikimas bandomąja medžiaga

#### Pirminiai žiurkių hepatocitai

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

#### Gerai žinomos ląstelių linijos ir limfocitai

Autoradiografija: Ląstelių kultūros veikiamos bandomąja medžiaga atitinkamą laiko tarpą, po to veikiamos <sup>3</sup>H-TdR. Laiko trukmė parenkama atsižvelgiant į bandomosios medžiagos prigimtį, metabolitinių sistemų aktyvumus bei ląstelių tipą. Tam, kad būtų pasiekta pati intensyviausia neplanuota DNR sintezė, <sup>3</sup>H-TdR turi būti įnešamas arba vienu metu su bandomąja medžiaga arba praėjus kelioms minutėms po to, kai buvo įnešta bandomoji medžiaga. Kuri procedūra bus pasirinkta, nulems tarpusavio sąveika tarp bandomosios medžiagos ir <sup>3</sup>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 pridėdant į terpę hidroksišlapalo.

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

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

Analizė

#### *Autoradiografiniai nustatymai*

Įvertinant neplanuotos DNR sintezės intensyvumą ląstelių kultūroje, neskaičiuojami branduoliai, esantys S fazėje. Reikėtų suskaičiuoti mažiausiai 50 ląstelių, esant vienai koncentracijai. Kiekviename stiklėlyje reikia suskaičiuoti ketletą 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 bandomajame bei kontroliniame mėginiuose.

Visi rezultatai turėtų būti patvirtinti, atlikus nepriklausomą bandymą.

## 2. DUOMENYS

Duomenys turėtų būti pateikiami lentelėse.

### 2.1. AUTORADIOGRAFINIAI NUSTATYMAI

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

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

### 2.2. SKYSTOSIOS SCINTILIACIJOS ĮVYKIŲ NUSTATYMAI

Nustatant skystosios scintiliacijos įvykius,  $^3\text{H-TdR}$  įsijungimą išreikšti dpm/ $\mu\text{g}$  DNR. Apibūdinant įsijungimo pasiskirstymą, galima panaudoti dpm/ $\mu\text{g}$  DNR vidurkį bei standartinį nukrypimą.

Duomenis reikėtų įvertinti atitinkamais statistiniais metodais.

## 3. ATASKAITA

### 3.1. BANDYMO ATASKAITA

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

- panaudotos ląstelės, tankumas ir persėjimų skaičius veikimo metu, ląstelių kultūrų skaičius,
- ląstelių kultūrų kultivavimo metodai, įskaitant terpę, temperatūrą ir  $\text{CO}_2$  koncentraciją,
- bandomoji medžiaga, priemonė, koncentracijos ir bandymo metu naudojamų koncentracijų pasirinkimo kriterijai,
- metabolinės aktyvacijos sistemų apibūdinimas,
- veikimo tvarkaraštis,
- teigiamos ir neigiamos kontrolės,
- panaudotas autoradiografinis metodas,



- ląstelių patekimo į S fazę blokavimo procedūros,
- DNR išskyrimo ir absoliutaus kiekio nustatymo procedūros, atliekant skystosios scintiliacijos įvykių registraciją,
- dozės ir atsako sąsaja, jei įmanoma,
- statistinis įvertinimas,
- rezultatų aptarimas,
- rezultatų aiškinimas.

### 3.2. ĮVERTINIMAS IR AIŠKINIMAS

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

### 4. NUORODOS

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

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

## 1. METODAS

## 1.1. ĮVADAS

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

## 1.2. APIBRĖŽTYS

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

## 1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Nėra.

## 1.4. BANDYMO METODO PRINCIPAS

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

Žinduolių ląstelės veikiamos bandomąja 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. BANDYMO METODO APIBŪDINIMAS

*Pasiruošimas bandymui*

- Bandymo metu galima naudoti pirmines kultūras (žmogaus limfocitai) arba gerai žinomas ląstelių linijas (pvz., kuniškojo žiurkėno kiaušidžių ląsteles). Reikėtų patikrinti, ar ląstelių linijos neužsikrėtusios mikoplazmomis.
- Reikėtų naudoti atitinkamą kultivavimui skirtą terpę bei parinkti inkubacijos sąlygas (pvz., temperatūra, indai, skirti kultivavimui, CO<sub>2</sub> koncentracija bei drėgmė).
- Prieš veikiant ląsteles bandomosiomis medžiagomis, šios turi būti paruoštos kultivavimui skirtoje terpėje arba, panaudojant atitinkamus prietaisus, ištirpintos ar suspenduotos. Panaudojant tirpiklį kaip kontrolę, reikėtų stebėti, kad, naudojant atitinkamą prietaisą, pasiekta bandomosios medžiagos galutinė koncentracija kultivavimui skirtoje sistemoje ypatingai neįtakotų ląstelių gyvybingumo ar augimo greičio bei apsikeitimo seserinėmis chromatidėmis dažnumo.
- Ląstelės turėtų būti veikiamos bandomąja medžiaga, esant arba nesant egzogeninei žinduolių metabolinės aktyvacijos sistemai. Jei naudojami ląstelių, turinčių metabolinę aktyvacijos sistemą, tipai, tai aktyvumo greitis ir prigimtis turėtų atitikti bandomąją cheminių junginių klasę.

*Bandymo sąlygos*

*Kultūrų skaičius*

Kiekvieno eksperimento etapo metu reikėtų naudoti mažiausiai dvi kultūras.

## Teigiamos ir neigiamos kontrolės

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

Toliau pateikiamos medžiagos, kurias galima naudoti kaip teigiamas kontroles:

- tiesiogiai veikias junginys:
  - etilmetansulfonatas,
- netiesiogiai veikias junginys:
  - ciklofosfamidai.

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

## Veikimo koncentracijos

Reikėtų naudoti mažiausiai tris bandomosios medžiagos koncentracijas, tinkamai atskirtas vieną nuo kitos. Didžiausia koncentracija turėtų sukelti intensyvių toksinių poveikį, tačiau nesutrukdyti ląstelių replikacijos ciklui vykti. Panaudojant atitinkamas procedūras turėtų būti bandomi santykinai vandenyje netirpūs junginiai, kad būtų nustatyta jų tirpumo riba. Pavienio bandymo metu turėtų būti nustatyta laisvai vandenyje tirpstančių netoksinių junginių didžiausia bandomoji koncentracija.

## Bandymo eiga

### Kultūrų paruošimas

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

### Veikimas

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

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

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

### Ląstelių surinkimas

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

## Chromosomų paruošimas ir dažymas

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

### Analizė

Analizuojamų ląstelių skaičius turėtų būti pagrįstas apskaitinimui seserinėmis chromatidėmis spontanišku kontroliniu dažniu. Įprastiniu atveju, tiriant apskaitinimą seserinėmis chromatidėmis, mažiausiai 25 gerai matomos metafazės yra analizuojamos. Objektiniai stikleliai užkoduojami prieš analizę. Žmogaus limfocitų atveju, analizuojamos tik metafazėje esančios chromosomos, turinčios 46 chromatides. Gerai žinomų ląstelių linijų atveju analizuojamos tik tos metafazinės chromosomos, kurios turi  $\pm 2$  modalinį skaičių centromerų. Reikėtų nurodyti ar, tiriant apskaitinimą 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 apskaitinimų seserinėmis chromosomomis kiekvienoje metafazinėje ir nemetafazinėje chromosomoje skaičius.

Rezultatai turėtų būti įvertinti atitinkamais statistiniais metodais.

## 3. ATASKAITA

### 3.1 BANDYMO ATASKAITA

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

- panaudotos ląstelės, ląstelių kultūrų kultivavimo metodai,
- bandymo sąlygos: terpės sudėtis, CO<sub>2</sub> koncentracija, bandomosios 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,
- objektinių stiklelių paruošimo metodo aprašymas,
- išanalizuotų metafazių skaičius (kiekvienos kultūros bandymo duomenys pateikiami atskirai),
- apskaitinimų seserinėmis chromatidėmis vienoje ląstelėje ir vienoje chromosomoje vidurkis (kiekvienos kultūros bandymo duomenys pateikiami atskirai),
- apskaitinimo seserinėmis chromatidėmis vertinimo kriterijai,
- dozės pasirinkimo kriterijai,
- dozės ir atsako sąsaja, jei įmanoma,
- statistinis įvertinimas,
- rezultatų aptarimas,
- rezultatų aiškinimas.

3.2. ĮVERTINIMAS IR AIŠKINIMAS

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

4. **NUORODOS**

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

**B.20. DROSOPHILA MELANOGASTER NUO LYTIES PRIKLAUSOMO RECESYVINIO LETALIŠKUMO BANDYMAS****1. METODAS****1.1. ĮVADAS**

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

**1.2. APIBRĖŽTYS**

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

**1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS**

Nėra.

**1.4. BANDYMO METODO PRINCIPAS**

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

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

**1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI**

Nėra.

**1.6. BANDYMO METODO APIBŪDINIMAS**

*Pasiruošimas bandymui*

*Padermės*

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.

*Bandomoji medžiaga*

Bandomosios 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 dimetilsulfoksidą (DMSO) kaip tirpinimo priemonę.

*Gyvūnų skaičius*

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

*Davimo būdas*

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

## Teigiamų ir neigiamų kontrolių naudojimas

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

## Veikimo dozė

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

## Bandymo eiga

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

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

## 2. DUOMENYS

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

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

## 3. ATASKAITA

### 3.1. BANDYMO ATASKAITA

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

- padermė: panaudotos *Drosophila* padermės ar kamienai, vabzdžių amžius, paveiktų patinų skaičius, sterilių patinų skaičius, sukurtų  $F_2$  kartos kultūrų skaičius,  $F_2$  kultūrų, neturinčių palikuonių, skaičius, chromosomų, turinčių letalią mutaciją, nustatytą embrioninės linijos ląstelėse, skaičius,
- grupių, kurios veikiamos, dydžio nustatymo kriterijai,
- bandymo sąlygos: išsamus veikimo ir mėginių paėmimo tvarkaraštis, veikimo koncentracijos, toksiškumo bandymo duomenys, neigiamos (tirpiklis) ir teigiamos kontrolės, jeigu reikia,
- letalių mutacijų įvertinimo kriterijai,
- dozės ir atsako sąsaja, jei įmanoma,
- duomenų įvertinimas,

— rezultatų aptarimas,

— rezultatų aiškinimas.

### 3.2. ĮVERTINIMAS IR AIŠKINIMAS

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

### 4. NUORODOS

Žr. Bendrojo įvado B dalį.



B.21. ŽINDUOLIŲ LAŠTELIŲ TRANSFORMACIJOS BANDYMAI *IN VITRO*

## 1. METODAS

## 1.1. ĮVADAS

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

## 1.2. APIBRĖŽTYS

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

## 1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Nėra.

## 1.4. BANDYMO METODO PRINCIPAS

Siekiant nustatyti cheminių medžiagų, sukeliančių ląstelių piktybinę transformaciją *in vivo* ir ląstelių fenotipo pokyčius *in vitro*, gali būti naudojamos žinduolių ląstelių kultūrų sistemos. Plačiai naudojamoms ląstelių linijoms priklauso C3H10T<sub>1/2</sub>, 3T3, SHE bei Fischer žiurkių ląstelės ir testai grindžiami ląstelių morfologijos pokyčiais, ligos židinio formavimosi bei prisitvirtinimo prie pusiau kieto agaro pokyčių tyrimais. Mažiau naudojamoms sistemoms priklauso tos, kurios naudojamos fiziologiniams bei morfologiniams ląstelių, paveiktų kancerogeninėmis cheminėmis medžiagomis, pokyčiams nustatyti. Nė vieno *in vitro*, testų metu nebuvo nustatyta mechanistinio ryšio tarp vėžio ir ląstelių pokyčių. Naudojant kai kurias bandomąsias sistemas, galima nustatyti protoonkogenų promotorius. Įvertinant bandomosios medžiagos įtaką ląstelių kultūrų sugebėjimui suformuoti kolonijas (klonavimo efektyvumas) arba augimo greičiams, galima nustatyti citotoksiškumą. Citotoksiškumo įvertinamas tam, kad būtų nustatyta, jog bandomoji medžiaga, kuria buvo veikiama, sukelia toksikologinį poveikį ir kurios negalima naudoti visuose bandymuose, apskaičiuojant transformacijos dažnį, kadangi šiuo atveju ląstelių inkubaciją ar persėjimą reikėtų pratęsti.

## 1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

Nėra.

## 1.6. BANDYMO METODO APIBŪDINIMAS

*Pasiruošimas bandymui*

Ląstelės

Priklausomai nuo naudojamo testo transformacijai įvertinti, galima naudoti įvairiausias ląstelių linijas ar pirmines ląsteles. Tyrėjas privalo užtikrinti, kad bandomąsias ląsteles paveikus žinomais kancerogenais, šiose pasireiškia atitinkami fenotipiniai pokyčiai ir kad įrodyta bei dokumentiškai patvirtinta, jog tyrėjo laboratorijoje vartojamas bandymas yra oficialiai pripažįstamas ir patikimas.

Terpė

Atliekant transformacijos bandymą, reikėtų naudoti atitinkamą terpę bei parinkti atitinkamas eksperimentines sąlygas.

Bandomoji medžiaga

Prieš veikiant ląsteles, bandomosios medžiagos gali būti paruošiamos kultivavimui skirtoje terpėje arba ištirpinamos ar suspenduojamos atitinkamomis priemonėmis. Tirpinančiosios priemonės galutinė koncentracija ląstelių kultūrų sistemoje neturėtų įtakoti ląstelių gyvybingumo, augimo greičio ar pasitaikančios transformacijos.

Metabolinė aktyvacija

Ląstelės turėtų būti veikiamos bandomąja medžiaga, tiek esant, tiek ir nesant metabolinės aktyvacijos sistemos. Kai naudojami ląstelių, pasižyminčių metaboliniu aktyvumu, tipai, tai aktyvumo prigimtis turėtų atitikti tą klasę, kuriai priklauso naudojamas cheminis junginys.

### *Bandymo sąlygos*

#### Teigiamų ir neigiamų kontrolių naudojimas

Kiekvieno eksperimento metu reikėtų naudoti teigiamas kontroles, sudarytas tiek iš tiesiogiai veikiančio junginio, tiek iš junginio, kurį reikia metaboliškai aktyvuoti; taipogi reikėtų naudoti ir neigiamas (priemonė) kontroles.

Žemiau pateikiamos medžiagos, kurias galima naudoti kaip teigiamas kontroles:

- tiesiogiai veikiantys junginiai:
  - etilmetansulfonatas,
  - $\beta$ -propiolaktonas,
- junginiai, kuriuos reikia aktyvuoti metaboliškai:
  - 2-acetilaminofluorenas,
  - 4-dimetilaminobenzenas,
  - 7,12-dimetilbenzantracenas.

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

#### Veikimo koncentracijos

Bandomąją medžiagą reikėtų vartoti keliomis koncentracijomis. Šios koncentracijos turėtų sukelti nuo koncentracijos priklausomą toksinį poveikį, esant didžiausiai koncentracijai, ląstelių išgyvenimas turėtų sumažėti, tačiau esant mažiausiai koncentracijai, jis turėtų būti toks, kaip ir neigiamai kontrolei esant terpėje. Panaudojant atitinkamas procedūras turėtų būti bandomi santykinai vandenyje netirpūs junginiai, kad būtų nustatyta jų tirpumo riba. Pavienio bandymo metu turėtų būti nustatyta laisvai vandenyje tirpstančių netoksinių junginių didžiausia bandomoji koncentracija.

### *Bandymo eiga*

Ląstelės turėtų būti veikiamos atitinkamą laiką, priklausomai nuo naudojamos bandymo sistemos ir veikimo metu galima pakartotinai veikti su ta pačia medžiagos doze, pakeičiant terpę (jei būtina, į terpę įnešama šviežiai paruošto metabolinės aktyvacijos mišinio), jei veikimo laikas pailginamas. Ląstelės, nepasižyminčios efektyviai veikiančia metaboline aktyvacija, turėtų būti veikiamos bandomąja medžiaga, esant arba nesant atitinkamai metabolinės aktyvacijos sistemai. Baigiantis veikimui, ląstelės atplaunamos nuo neprisirišusios bandomosios medžiagos ir, kai nustatoma transformacija bei pasirodo transformuotas fenotipas, kultivuojamos atitinkamomis sąlygomis. Visi rezultatai patvirtinami, atlikus nepriklausomą eksperimentą.

## 2. DUOMENYS

Duomenys turėtų būti pateikti lentelėse įvairiausiomis formomis, priklausomai nuo atlikto bandymo, pvz., nurodant lėkštelių skaičių, teigiamas lėkšteles ar transformuotų ląstelių skaičių. Jeigu reikia, išgyvenimas išreiškiamas procentais kontrolės laipsnio atžvilgiu ir transformacijos dažnis išreiškiamas transformuotų ląstelių, esančių išgyvenusių ląstelių tarpe, skaičiumi.

## 3. ATASKAITA

### 3.1. BANDYMO ATASKAITA

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

- panaudotų ląstelių tipas, ląstelių kultūrų skaičius, ląstelių kultūrų kultivavimo metodai,

- bandymo sąlygos: bandomosios medžiagos koncentracija, panaudota priemonė, inkubacijos laikas, veikimo trukmė ir dažnis, ląstelių populiacijos tankis veikimo metu, panaudotos egzogeninės metabolinės aktyvacijos sistemos tipas, teigiamos ir neigiamos kontrolės, stebimo ląstelių fenotipo ypatumai, panaudota atrankos sistema (jei įmanoma), dozės pasirinkimo kriterijai,
- gyvų ir transformuotų ląstelių skaičiaus nustatymo metodas,
- statistinis įvertinimas,
- rezultatų aptarimas,
- rezultatų aiškinimas.

### 3.2. ĮVERTINIMAS IR AIŠKINIMAS

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

### 4. NUORODOS

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

## B.22. GRAUŽIKŲ DOMINANTINIS LETALIŠKUMO BANDYMAS

## 1. METODAS

## 1.1. ĮVADAS

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

## 1.2. APIBRĖŽTYS

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

## 1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Nėra.

## 1.4. BANDYMO METODO PRINCIPAS

Dominantiniai letalūs poveikiai sukelia embriono arba gemalo žūtį. Veikiant chemine medžiaga, sukeliama dominantiniai letalūs poveikiai, kurie rodo, kad bandomoji medžiaga paveikė bandomosios rūšies gyvūnų embrionų audinius. Apskritai manoma, kad dominantiniai letalūs poveikiai pasireiškia dėl chromosomų pažeidimų (struktūrinės anomalijos arba chromosomų skaičiaus pokyčiai). Jei patelės paveikiamos medžiaga, ir jų embrionai žūsta, tai šitai taip pat įvyksta dėl toksinių poveikių.

Apskritai, gyvūnų patinai paveikiami bandomąja medžiaga, o vėliau poruojami su nekaltomis patelėmis, nepaveiktomis bandomąja medžiaga. Poruojant individus paeiliui, tam tikrais laiko tarpais, galima atskirai tirti įvairius embrioninės ląstelės vystymosi etapus. Jei, lyginant su kontrolinės grupės patelių negyvų implantų skaičiumi, šių implantų skaičius padaugėja kiekvienoje paveiktos grupės patelėje, tai rodo, kad implantacija nepavyko. Nesėkmė, atliekant išankstinę implantaciją, gali būti vertinama pagal *corpora lutea* kiekį arba lyginant absoliutų implantų bandomos bei kontrolinės grupės patelėse skaičių. Absoliutus dominantinio letalaus poveikio apima nesėkmės, atliekant išankstinę bei vėlesnę implantacijas. Absoliutus dominantinio letalaus poveikio įvertinimas paremtas gyvų implantų, esančių bandomos bei kontrolinės grupės patelėse, kiekio palyginimu. Konkrečiais laiko intervalais dėl ląstelių (tokių kaip spermatocitų ir (ar) spermatogonijų) žūties gali sumažėti implantų skaičius.

## 1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

Nėra.

## 1.6. BANDYMO METODO APIBŪDINIMAS

*Pasiruošimas bandymui*

Jei įmanoma, bandomosios medžiagos turėtų būti ištirpintos ar suspenduotos izotoniniame druskų tirpale. Vandenyje netirpios cheminės medžiagos turi būti ištirpintos ar suspenduotos, panaudojus atitinkamus nešiklius. Naudojamas nešiklis neturi interferuoti su bandomąja chemine medžiaga ir neturi būti toksiškas. Reikėtų naudoti šviežiai paruoštus bandomosios cheminės medžiagos preparatus.

*Bandymo sąlygos*

## Davimo būdas

Paprastai bandomasis junginys turėtų būti duodamas vieną kartą. Remiantis toksikologine informacija, veikimą galima pakartoti. Paprastai bandomoji medžiaga duodama per į trachėją įvedamą vamzdelį arba įnekuojant bandomąją medžiagą į pilvą. Medžiagą galima duoti ir kitais būdais.

## Eksperimentiniai gyvūnai

Rekomenduojama tirti žiurkes arba peles. Sveiki visiškai lytiškai subrendę gyvūnai atsitiktinai pasirenkami ir suskirstomi į bandomąją bei kontrolines grupes.

### Skaičius ir lytis

Atsižvelgiant į vertinamų biologinių savybių spontanineis variacijas, reikėtų naudoti pakankamą skaičių patinų, paveiktų bandomąja medžiaga. Skaičius turėtų būti pasirenkamas remiantis iš anksto nustatyto aptikimo jautrumu bei gaunamų duomenų svarba. Pavyzdžiui, atliekant tipinį testą, patinų, priklausančių grupėms, kurių kiekvienai duodama skirtinga dozė, turi būti tiek, kad vieno poravimosi periodo metu būtų apvaisinta 30–50 patelių.

### Teigiamų ir neigiamų kontrolinių bandinių naudojimas

Atliekant kiekvieną eksperimentą, paprastai vienu metu reikėtų naudoti teigiamą bei neigiamą (nešiklio) kontrolinius bandinius. Kai galima susipažinti su toje pačioje laboratorijoje ką tik atliktų eksperimentų, naudojant teigiamą kontrolinį bandinį, gautais patenkinamais rezultatais, tai šiuos rezultatus galima naudoti vietoj teigiamos kontrolės, naudojamos tuo pačiu metu. Teigiamos kontrolinės medžiagos turėtų būti naudojamos atitinkamomis mažomis dozėmis (pvz., MMS, injekuojamos į pilvą, dozė turi siekti 10 mg/kg) siekiant įrodyti bandymo metodo jautrumą.

### Veikimo dozė

Reikėtų naudoti tris veikimo dozes. Didelė dozė turėtų sukelti toksiškumo požymius arba sumažinti gyvūnų, paveiktų bandomąja medžiaga, vaisingumą. Konkrečiais atvejais užtenka ir pavienės didelės dozės.

### Ribinis bandymas

Duodant netoksines bandomąsias medžiagas vieną kartą, jų koncentracija turi siekti 5 g/kg, o duodant pakartotinai – 1 g/kg/dieną.

### Bandymo eiga

Bandomąsias medžiagas galima duoti įvairiai. Dažniausiai bandomoji medžiaga duodama vieną kartą.

Pasibaigus veikimui, atitinkamais laiko tarpais pavieniai patinai paeiliui poruojami su bandomąja medžiaga nepaveiktomis nė karto nesiporavusiomis 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.

Pasibaigus veikimui, atliekama tiek poravimų, kiek yra numatyta veikimo tvarkaraštyje bei turėtų būti užtikrinta, kad pasibaigus veikimui, mėginiai paimami atskirais embrioninės ląstelės vystymosi etapais.

Patelės numarinamos praėjus pusei gestacijos periodo ir gimdos turinys ištiriamas tam, kad būtų nustatytas gyvų bei žuvusių implantų skaičius. Reikia iširti kiaušides, kad būtų nustatytas *corpora lutea* skaičius.

## 2. DUOMENYS

Duomenys turėtų būti pateikiami lentelėse, nurodant patinų ir vaikingų bei nevaikingų patelių skaičių. Reikėtų atskirai registruoti kiekvieno suporavimo rezultatus, nurodant kiekvieno patino ir patelės tapatybę. Taipogi kiekvienos patelės atveju reikėtų registruoti suporavimo savaitę, patinų gautą dozę, gyvų bei negyvų implantų egzistavimo dažnį.

Absolūtus dominantinių letalių poveikių skaičius nustatomas, lyginant gyvų implantų skaičių bandomosios bei kontrolinės grupės patelėse. Bandomosios grupės patelių gyvų bei negyvų implantų skaičiaus santykis palyginamas su tokiu pačiu kontrolinės grupės implantų skaičiaus santykiu siekiant nustatyti, ar implantacija nepavyko.

Jei tarp pateikiamų duomenų nurodomos ankstyvosios bei vėlyvosios žūtys, tai šitai turi būti aiškiai parodyta lentelėse. Jeigu nustatoma, kad išankstinė implantacija nepavyko, tai ji turi būti užregistruota. Ar išankstinė implantacija pavyko ar ne, sprendžiama, lyginant pagal *corpora lutea* ir implantų skaičiaus skirtumus arba pagal vidutinio implantų gimdoje skaičiaus sumažėjimą bandomojoje grupėje, lyginant su poravimais kontrolinėje grupėje.

Rezultatai turėtų būti įvertinti atitinkamais statistiniais metodais.

### 3. ATASKAITA

#### 3.1. BANDYMO ATASKAITA

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

- rūšis, atmaina, panaudotų gyvūnų amžius bei svoris, eksperimentinėje bei kontrolinėse grupėse esančių kiekvienos lyties gyvūnų skaičius,
- bandomoji medžiaga, priemonė, dozės, ir dozių pasirinkimo kriterijai, neigiamos ir teigiamos kontrolės, toksiškumo duomenys,
- davimo būdas ir veikimo tvarkaraštis,
- suporavimo tvarkaraščiai,
- metodas, kuriuo nustatoma, kad suporavimas įvyko,
- numarinimo laikas,
- dominantinių letalių mutacijų įvertinimo kriterijai,
- dozės ir atsako sąsaja, jei įmanoma,
- statistinis įvertinimas,
- rezultatų aptarimas,
- rezultatų aiškinimas.

#### 3.2. ĮVERTINIMAS IR AIŠKINIMAS

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

### 4. NUORODOS

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

**B.23. ŽINDUOLIŲ SPERMATOGONIJŲ CHROMOSOMŲ ABERACIJOS BANDYMAS****1. METODAS**

Šis metodas atitinka OECD TG 483 – Žinduolių spermatozoidų chromosomų aberacijos bandymą (1997).

**1.1. ĮVADAS**

Žinduolių spermatozoidų chromosomų aberacijos bandymo *in vivo* tikslas – identifikuoti medžiagas, sukeliančias žinduolių spermatozoidų 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 bandymo metu nustatomi spermatozoidų gemalinių ląstelių chromosomų pokyčiai, kuriais remiantis prognozuojama apie paveldimų mutacijų atsiradimą gemalinėse ląstelėse.

Atliekant šį bandymą paprastai panaudojami graužikai. Šio citogenetinio bandymo metu *in vivo* nustatomos chromosominio tipo aberacijos, atsirandančios spermatozoidų mitozinėse chromosomose. Kitos ląstelės nėra naudojamos šiam bandymui atlikti.

Tam, kad spermatozoiduose būtų identifikuotos chromatidinės aberacijos, tiriama ląstelių pirmoji mitozė, vykstanti iškart po to, kai ląstelės buvo paveiktos bandomąja medžiaga tam, kad, ląstelėms dalijantis, šie pakitimai nebūtų prarandami. Papildomą informaciją apie bandomąją medžiaga paveiktas spermatozoidų kamienines ląsteles galima gauti, analizuojant mejozines chromosomas bei ieškant chromosominių aberacijų ląstelių, esančių I diakinezės metafazės stadijoje, kai šios, paveiktos bandomąja medžiaga, tampa spermatocitais, chromosomose.

Šio bandymo, atliekamo *in vivo* sąlygomis, metu siekiama nustatyti, ar somatinių ląstelių mutacijas sukeliantys mutagenai gali jas sukelti ir gemalinėse ląstelėse. Be to, spermatozoidų bandymas yra svarbus, įvertinant mutagenų padarytą žalą, pagal kurią sprendžiama apie faktorių, reguliuojančių metabolizmą, farmakokinetiką bei DNR pažaidų atstatymo procesus, reikšmę.

Sėklidėse yra daug skirtingoms generacijoms priklausančių spermatozoidų, kurios tarpusavyje skiriasi pagal jautrumą cheminių medžiagų poveikiui. Todėl identifikuotos aberacijos parodo spermatozoidų populiacijų, kurių pagrindinę dalį sudaro daug diferencijuotų spermatozoidų, paveiktų bandomąja medžiaga, bendrąjį atsaką. Priklausomai nuo jų lokalizacijos sėklidėse, skirtingų generacijų spermatozoidų gali arba patekti arba nepatekti į bendrąją cirkuliaciją, nes egzistuoja fizinis ir fiziologinis (Sertoli ląstelių bei kraujo ir sėklidžių) barjerai.

Jeigu nustatoma, kad bandomoji medžiaga arba reaktyvusis metabolitas nepasiekia audinio, į kurį buvo nukreiptas, tai šio bandymo metu jis daugiau nebenaudojamas.

Taip pat žr. Bendrojo įvado B dalį.

**1.2. APIBRĖŽTYS**

**Chromatidinė aberacija** – struktūrinis chromosomos pakenkimas, pasireiškiantis kaip pavienių chromatidžių suardymas arba kaip chromatidžių suardymas ir susijungimas.

**Chromotidinė aberacija** – struktūrinis chromosomos pakenkimas, pasireiškiantis kaip abiejų seserinių chromatidžių trūkis arba jų abiejų trūkis ir susijungimas toje pačioje vietoje.

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

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

**Poliploidiskumas** – haploidinio chromosomų skaičiaus ( $n$ ), išskyrus diploidinį skaičių (t. y.  $3n$ ,  $4n$  ir t. t.), kartotinis.

**Struktūrinė aberacija** – chromosomos struktūros pokytis, kurį galima nustatyti dalijimosi ciklo metafazėje esančias ląsteles tiriant mikroskopu; jis pasireiškia kaip delecijos ir fragmentai, pokyčiai grandinių viduje ar tarp grandinių.

### 1.3. BANDYMO METODO PRINCIPAS

Gyvūnai veikiami bandomąja chemine medžiaga pagal atitinkamą veikimo chemine medžiaga metodiką ir atitinkamais laiko momentais po veikimo numarinami. Prieš numarinimą gyvūnai paveikiami medžiaga, sustabdanti ląstelių dalijimąsi metafazėje (pavyzdžiui, kolchicinu arba Kolcemidu®). Iš gemalinių ląstelių išskiriamos chromosomos, jos dažomos ir metafazėje esančios ląstelės tiriamos mikroskopu, kad būtų nustatytos chromosomų aberacijos.

### 1.4. BANDYMO METODO APRAŠYMAS

#### 1.4.1. **Paruošimas**

##### 1.4.1.1. *Gyvūnų rūšies pasirinkimas*

Paprastai naudojami kuniško žiurkėno ir pelių patinėliai. Tačiau gali būti naudojami ir kitų atitinkamų žinduolių rūšių patinai. Reikia naudoti visuotinai naudojamų laboratorinių atmainų jaunos sveikus subrendusius gyvūnus. Bandyto pradžioje gyvūnų svorio variacija turi būti minimali ir neviršyti  $\pm 20\%$  vidutinio svorio.

##### 1.4.1.2. *Laikymo ir šėrimo sąlygos*

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

##### 1.4.1.3. *Gyvūnų paruošimas*

Sveiki jauni subrendę gyvūnai pasirinktinai suskirstomi į kontrolinę bei bandomąją (kuriai priskirti individai bus veikiami chemine medžiaga) grupes. Narvai pastatomi taip, kad būtų kuo labiau sumažintas aplinkos poveikis, susijęs su narvų išdėstymu. Kiekvienas gyvūnas turi savo identifikacijos ženklą. Prieš pradėdant bandymą, gyvūnams leidžiama aklimatizuotis prie laboratorinių sąlygų mažiausiai per 5 dienas.

##### 1.4.1.4. *Dozių paruošimas*

Kietosios bandomosios cheminės medžiagos ištirpinamos arba suspenduojamos atitinkamuose tirpikliuose ar nešikliuose ir jei reikia, tai, prieš paruošiant jų dozes, skirtas gyvūnams, jos praskiedžiamos. Skystųjų bandomųjų medžiagų dozės ruošiamos iškart arba prieš dozių paruošimą, jos praskiedžiamos. Prieš kiekvieną bandymą šviežiai paruošiami bandomosios cheminės preparatai ir neatsižvelgiama į stabilumo tyrimo metu gautus duomenis, rodančius, kad medžiaga atitinka jos laikymui keliamus reikalavimus.

#### 1.4.2. **Bandymo sąlygos**

##### 1.4.2.1. *Tirpiklis/nešiklis*

Naudojamos tirpiklio ar nešiklio dozės neturėtų sukelti jokio toksinio poveikio ir neturėtų kilti spėlionių, kad jis gali chemiškai reaguoti su bandomąja medžiaga. Jeigu naudojami kiti mažiau žinomi tirpikliai/nešikliai, prieš pradėdant juos naudoti, reikia pateikti jų tinkamumą įrodančius duomenis. Jei yra įmanoma, tai pirmiausia rekomenduojama naudoti vandeninį tirpiklį arba nešiklį.

##### 1.4.2.2. *Kontroliniai mėginiai*

Kiekvieno bandymo metu turi būti tiriami iš kiekvienai lyčiai priklausančių gyvūnų paimti vienu metu naudojami teigiami ir neigiami (tirpiklis/nešiklis) kontroliniai mėginiai. Išskyrus veikimą bandomąja medžiaga, kontrolinės grupės gyvūnai turi būti laikomi tomis pačiomis sąlygomis kaip ir gyvūnai, paveikti bandomąja chemine medžiaga (bandomoji grupė).

Spermatogoninių ląstelių, paveiktų tokia pačia bandomosios cheminės medžiagos doze *in vivo*, teigiamuose kontroliniuose mėginiuose turi būti nustatomos struktūrinės aberacijos, kurios, kaip tikimasi, užgoš lengvai nustatomą pašalinį foną.



Pasirenkamos tokios teigiamos kontrolinės dozės, kad gaunami poveikiai būtų ryškūs, bet kad tyrėjas ne iškart dešifruotų užkoduotus objektyvius stiklelius. Priimtina, kad teigiami kontroliniai mėginiai būtų duodami gyvūnams kitaip nei bandomoji medžiaga bei būtų tik vieną kartą paaimami. 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.
ciklofosfamidai	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
Monomernis akrilamidai	79-06-1	201-173-7
Trietilenmelaminas	51-18-3	200-083-5

Neigiami kontroliniai mėginiai, paveikti arba tirpikliu ar tik nešikliu, arba paveikti taip pat kaip ir bandomosios grupės, turi būti kiekvieną kartą paaimami, nekreipiant dėmesio į anksčiau atliktų bandymų metu gautus kontrolinius duomenis, rodančius, kad variacijos laipsnis tarp gyvūnų ir ląstelių, kuriose stebimos chromosomų aberacijos yra priimtini. Jei neigiami kontroliniai mėginiai paaimami tik vieną kartą, tai pirmojo paėmimo laikas yra pats priimtinausias. Be to, reikia papildomai panaudoti bandomąją medžiaga neveiktus kontrolinius mėginius, nekreipiant dėmesio į anksčiau atliktų bandymų bei publikuotus duomenis, rodančius, kad pasirinktas tirpiklis ar nešiklis nesukėlė jokių žalingų ar mutageninių poveikių.

#### 1.5. BANDYMO ATLIKIMO METODIKA

##### 1.5.1. Gyvūnų skaičius

Kiekvienoje bandomojoje ir kontrolinėje grupėje turi būti mažiausiai 5 bandomieji patinėliai.

##### 1.5.2. Veikimo tvarkaraštis

Bandomosiomis medžiagomis geriausia veikti vieną kartą arba dukart (pavienis veikimas arba 2 veikimai). Bandomosiomis medžiagomis galima veikti taikant vadinamąją išskaidytą dozę, kai tą pačią dieną atliekami du veikimai bandomąja medžiaga ir jų atlikimo laikas skiriasi ne daugiau kaip keletu valandų tam, kad būtų suteiktas pakankamai didelis bandomosios medžiagos tūris. Kita dozavimo tvarka turi būti mokslškai pagrįdžiama.

Kai gyvūnų grupei duodama didžiausia koncentracija, tai, pasibaigus veikimui, mėginiai paaimami 2 kartus. Kadangi bandomoji medžiaga gali turėti įtakos ląstelės ciklo kinetikai, tai, pasibaigus veikimui, mėginiai paaimami kuo anksčiau ir kuo vėliau 24–48 valandų laikotarpiu. Kai bandomos kitos (ne didžiausios) dozės, tai pasibaigus veikimui, mėginiai paaimami 24 valandų (arba 1,5 ląstelės ciklo trukmės) laikotarpiu, nebent yra žinomas kitas mėginių paėmimo laikas, kuris yra tinkamesnis, tiriant poveikius (6).

Be to, mėginius galima paaimti ir kitu metu. Pavyzdžiui, tiriant chemines medžiagas, sukeliančias chromosomų pertraukimus arba galinčias turėti įtakos nuo S nepriklausantiems efektams, mėginius galima paaimti 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 paaimami atitinkamu metu.

Prieš numarinimą, gyvūnams į pilvo plėvę suleidžiama atitinkama dozė metafazę sustabdančios medžiagos (pavyzdžiui, Kolcemido® ar kolchicino). Po atitinkamo intervalo iš gyvūnų paaimami 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 bandymas, tai jis turi būti atliekamas to pačioje laboratorijoje, naudojant tos pačios rūšies, kamieno ir lyties gyvūnus bei veikiant juos bandomąja chemine medžiaga pagal tą patį tvarkaraštį, kuris buvo naudojamas pagrindinio bandymo metu (7). Jeigu nustatomas toksiškumas, tai pirmą kartą imant mėginius, naudojami 3 dozių lygiai. Šie dozių lygiai turi apimti visą intervalą, pradedant nuo maksimumo ir baigiant minimumu arba tokia doze, kuri visiškai nėra toksiška. Vėlesniu mėginių paėmimo metu naudojama tik pati didžiausia dozė. Didžiausia dozė vadinama tokia doze, kuriai esant, išryškėja toksiškumo, priklausomo nuo dozės požymiai, tokie, kurie pasirodo, kai naudojant tokį patį dozavimo tvarkaraštį, suleidžiama didžiausia dozė ir spėjama, kad ji bus mirtina.

Medžiagos pasižyminti specifiniu biologiniu aktyvumu, kai jų dozės būna mažos ir netoksiškos (pavyzdžiui tokios kaip hormonai ir mitogenai) gali būti laikomos išimtimi, kai joms taikomi dozė nustatantys kriterijai ir tada jos bandomos 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. Ribinis bandymas

Jeigu bandymas atliekamas esant vienam dozės lygiui, kuris, per vieną dieną atliekant pavienį arba du poveikius bandomąja medžiaga, mažiausiai sudaro 2 000 mg/kg kūno masės/dieną ir jei nepastebima jokių toksinių poveikių bei, remiantis struktūriškai panašių cheminių medžiagų bandymų duomenimis, nebus tikimasi užregistruoti genotoksiškumo, tai tada laikomasi nuostatos, kad yra tikslinga atlikti visą bandymą panaudojant 3 dozių lygmenis. Numatomas bandomosios medžiagos poveikis žmogui gali parodyti, kad, atliekant ribų paieškos bandymą reikia naudoti aukštesnę dozės lygį.

#### 1.5.5. Dozavimas

Bandomoji medžiaga yra paprastai duodama, priverstinai maitinant per vamzdelį, įstatant jį į skrandį, tinkamai įvedant kaniulę per vamzdelį arba injekciją į pilvą. Bandomąją medžiagą galima įvesti ir kitais būdais, jei jie yra pagrindžiami. Maksimalus skysčio, priverstinai duodamo per vamzdelį arba injekuojamo į pilvą vienu metu, tūris priklauso nuo bandomojo gyvūno dydžio. Tūris neturi viršyti 2 ml/100 g kūno masės. Didėsių nei šių tūrių davimas turi būti pagrindžiamas. Išskyrus dirginančias ar esdinančias medžiagas, kurios, būdamos didesnėmis koncentracijomis, sukelia žalingus poveikius, bandomosios medžiagos tūrio kitimas turi būti sumažinamas iki minimumo, koncentraciją taip sureguliuojant, kad esant visiems dozių lygiams, tūris būtų pastovus.

#### 1.5.6. Chromosomų paruošimas

Iškart po numaravimo, iš gyvūnų išimami kaulų čiulpai, pamerkami į hipotoninį tirpalą ir fiksuojami. Vėliau kaulų čiulpų ląstelės išskleidomos ant objektyvinių stiklelių ir nudažomos.

#### 1.5.7. Analizė

Išanalizuojama mažiausiai 100 vieno gyvūno ląstelių (mažiausiai 500 vienos grupės metafazių). Šis skaičius gali būti sumažinamas, jei stebima daug chromosomų aberacijų. Visi tepinėliai (įskaitant teigiamus ir neigiamus kontrolinius mėginius) turi būti užkoduojami nepriklausomai vienas nuo kito tam, kad būtų galima juos ištirti mikroskopu. Kadangi dažnai ruošiant objektyvinius stiklelius, saardoma 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 bandymo rezultatai turi būti pateikiami lentelėse. Gyvūnas yra eksperimentinis vienetas. Turi būti nustatytas kiekvieno gyvūno ląstelių, turinčių struktūrinės aberacijos ir chromosomų aberacijų vienoje ląstelėje skaičius. Turi būti išvardinti skirtingi chromosomų struktūrinių aberacijų tipai, nurodant jų skaičių bei pasireiškimo dažnį gyvūnų, paveiktų ir nepaveiktų bandomąja chemine medžiaga, grupėse. Atskirai registruojama bei pranešama apie plyšių pasireiškimą, tačiau bendru atveju jie neįskaitomi, kai nustatomas absoliutinis aberacijų pasireiškimo dažnis.

Jei stebima tiek mitozė, tiek ir mejozė, tai turi būti nustatytas spermatogonijų mitozijų I ir II mejozinės metafazės metu santykis, naudojamas kaip citotoksiškumo matas paaimant bendrą mėginį (turintį 100 vieno gyvūno ląstelių) iš visų tirtų bei neigiamų kontrolinių gyvūnų tam, kad būtų nustatytas galimas citotoksinis poveikis. Jeigu stebima tik mitozė, tai kiekvieno gyvūno atveju, imant mažiausiai 1 000 ląstelių, nustatomas jų mitozinis indeksas.

### 2.2. REZULTATŲ ĮVERTINIMAS IR AIŠKINIMAS

Teigiamą rezultatą galima įvertinti keletu kriterijų, tokiais kaip nuo dozės priklausomas ląstelių su chromosominėmis aberacijomis skaičiaus padidėjimas arba akivaizdus ląstelių, turinčių aberacijos ir priklausančių pavienės dozės grupei pagal vienkartinį mėginio paėmimo laiką, skaičiaus padidėjimas. Pirmiausia reikia aptarti biologinę rezultatų reikšmę. Įvertinant bandymo metu gautus rezultatus, galima pasinaudoti statistiniais metodais (8). Statistinis reikšmingumas turėtų būti vienintelis faktorius, apsprendžiantis teigiamą atsaką. Abejotini rezultatai turėtų būti išaiškinti, toliau tęsiant bandymą ir pirmiausia pakeičiant eksperimentines sąlygas.

Jei tiriant medžiagą, gaunami rezultatai, neatitinkantys aukščiau išvardintų kriterijų, ši bandomoji medžiaga laikoma nemutageniška.

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

Tiriant chromosomų aberacijas *in vitro*, gauti teigiami rezultatai rodo, kad bandomoji medžiaga sukelia chromosomų aberacijas tirtos gyvūnų rūšies kaulų čiulpų ląstelėse. Neigiami rezultatai rodo, esant bandymo sąlygoms, bandomoji medžiaga nesukelia chromosomų aberacijų tirtos gyvūnų rūšies kaulų čiulpų ląstelėse.

Reikia aptarti tą galimybę, ar bandomoji medžiaga ar jos metabolitai pasieks bendrąją cirkuliaciją ar specifiniu būdu tą audinį, į kurį jie yra nukreipti (pavyzdžiui, sisteminio toksiškumo atveju).

### 3. ATASKAITA

#### BANDYMO ATASKAITA

Bandymo ataskaitoje turi būti pateikiama tokia informacija:

Tirpiklis/nešiklis įrenginys:

- priešastys, dėl kurių buvo pasirinktas šis nešiklis,
- bandomosios cheminės medžiagos, esančios tirpiklyje/nešiklyje įrenginyje, tirpumas ir stabilumas, jei toks yra žinomas.

Bandomieji gyvūnai:

- panaudota rūšis ar kamienas,
- gyvūnų skaičius ir amžius,
- šaltinis, laikymo sąlygos, maitinimas ir pan.,
- kiekvieno gyvūno svoris prieš pradedant bandymą ir kiekvienos grupės svorio riba, vidurkiai bei standartinis nukrypimas.

Bandymo sąlygos:

- ribų paieškos bandymo, jei jis buvo vykdomas, duomenys,
- pagrindinė priešastis, nulėmusi dozės dydžio pasirinkimą
- pagrindinė priešastis, nulėmusi davimo būdo pasirinkimą
- bandomosios medžiagos paruošimo apibūdinimas,
- bandomosios medžiagos davimo būdo apibūdinimas,
- pagrindinė priešastis, nulėmusi numarinimo laiko pasirinkimą
- bandomosios cheminės medžiagos, esančios pašaruose ir geriamajame vandenyje, koncentracijos (ppm) perversimas į tikrąją dozę (mg/kg kūno masės/dienai), jei tai įmanoma,
- duomenys apie pašarų ir geriamojo vandens kokybę,
- veikimo bandomąja medžiaga ir mėginio paėmimo tvarkaraščio išsamus aprašymas,

- metodai toksiškumui įvertinti,
- metafazę sustabdančios medžiagos prigimtis, jos koncentracija bei veikimo ja trukmė,
- objektinių stiklelių paruošimo metodai,
- aberacijų įvertinimo kriterijai,
- ląstelių, kurios buvo išskirtos iš vieno gyvūno bei išanalizuotos, skaičius,
- teigiamų, neigiamų ar abejotinių rezultatų nustatymo kriterijai.

Rezultatai:

- toksiškumo požymiai,
- mitozinis indeksas,
- I ir II mejozinėse metafazėse esančių ląstelių spermatogoninių mitozijų santykis,
- kiekvieno gyvūno ląstelių chromosomų aberacijų tipas ir skaičius,
- absoliutus aberacijų vienoje grupėje skaičius,
- vienos grupės ląstelių, turinčių aberacijas, skaičius,
- dozės ir atsako tarpusavio ryšys, jei tai įmanoma nurodyti,
- statistinės analizės, jei bet kokios buvo atliktos,
- duomenys apie vienu metu naudotas neigiamas kontroles,
- anksčiau gauti duomenys apie neigiamus kontrolinius mėginius, nurodant intervalus, vidurkius bei standartinius nukrypimus,
- duomenys apie vienu metu naudotus teigiamus kontrolinius mėginius,
- ploidiskumo pasikeitimai, jei buvo tokie stebimi.

Rezultatų aptarimas.

Išvados.

#### 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.24. PELIŲ TAŠKINIS BANDYMAS

## 1. METODAS

## 1.1. ĮVADAS

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

## 1.2. APIBRĖŽTYS

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

## 1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Nėra.

## 1.4. BANDYMO METODO PRINCIPAS

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

## 1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

Nėra.

## 1.6. BANDYMO METODO APIBŪDINIMAS

*Pasirošimas bandymui*

Jei įmanoma, bandomosios medžiagos turėtų būti ištirpintos ar suspenduotos izotoniniame druskų tirpale. Vandenyje netirpios cheminės medžiagos turi būti ištirpintos ar suspenduotos panaudojus atitinkamas priemones. Naudojama priemonė neturi trukdyti nei bandomajai cheminei medžiagai veikti, nei toksiniams poveikiams pasireikšti. Reikėtų naudoti šviežiai paruoštus bandomosios cheminės medžiagos preparatus.

*Ekspperimentiniai gyvūnai*

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

*Skaičius ir lytis*

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

*Teigiamų ir neigiamų kontrolių naudojimas*

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

## Davimo būdas

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

## Veikimo dozė

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

## Bandymo eiga

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

## Analizė

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

- a) baltos spalvos 5 mm diametro taškai, išsidėstę pilvo dalyje ir tikriausiai atsiradę dėl ląstelių žūties (BVPT);
- b) geltonos spalvos, panašūs į agučio (*agouti-like*) taškai, stebimi krūties, lytinių liaukų, viršugalvio ašinėje ir kirkšninėje srityse, kurie, kaip manoma, atsirado dėl sutrikusios ląstelių diferenciacijos (SDT);
- c) pigmentuoti ir baltos spalvos taškai, išsimėtę kailyje ir, manoma, kad tai susiję su somatinėmis mutacijomis (SMT).

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

Reikėtų registruoti akivaizdžias pagrindines morfologines anomalijas, pasireiškiančias palikuonių tarpe.

## 2. DUOMENYS

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

## 3. ATASKAITA

### 3.1. BANDYMO ATASKAITA

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

- poravimui panaudoti kamieniai,
- bandomoje bei kontrolinėse grupėse esančių vaikingų patelių skaičius,
- vidutinis vados dydis bandomojoje bei kontrolinėje grupėse gimimo bei atjunkymo metu,
- bandomosios cheminės medžiagos dozės,
- metodas, kuriuo nustatoma, kad suporavimas įvyko,
- panaudotas tirpiklis, – gestacijos diena, kurią buvo pradėtas veikimas bandomąja medžiaga,

- veikimo būdas,
- absoliutus įvertintų palikuonių ir bandomojoje bei kontrolinėje grupėse esančių BVPT, SMT ir SPT skaičius,
- pagrindinės morfologinės anomalijos,
- jei įmanoma, dozės ir atsako sąsaja SPT bandymo atveju,
- statistinis įvertinimas,
- rezultatų aptarimas
- rezultatų aiškinimas.

### 3.2. ĮVERTINIMAS IR AIŠKINIMAS

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

### 4. NUORODOS

Žr. Bendrojo įvado B dalį.



## B.25. PELIŲ PAVELDĖTA TRANSLOKACIJA

## 1. METODAS

## 1.1. ĮVADAS

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

## 1.2. APIBRĖŽTYS

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

## 1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Nėra.

## 1.4. BANDYMO METODO PRINCIPAS

Tiriant paveldimą translokaciją pelėse, nustatomi žinduolių embrioninių ląstelių chromosomų struktūriniai bei skaičiaus pokyčiai, kurie išnyksta pirmos kartos palikuonyse. Nustatomi tokie chromosomų pokyčiai: atvirkštinės translokacijos ir X-chromosomos praradimas tuo atveju, jei bandomos palikuonių patelės. Gyvūnų, turinčių translokacijas bei XO-patelių vaisingumas yra sumažėjęs ir pagal tai atrenkami  $F_1$  palikuonys, kurie bus naudojami citogenetinei analizei. Visiškas sterilumas stebimas konkrečių translokacijų atveju (X-autosoma ir c-t tipas). Atliekant citogenetinę analizę, translokacijos nustatomos arba  $F_1$  patinuose arba  $F_1$  patelių vyriškos lyties palikuonių ląstelėse, besidalijančiose mejozės būdu, ląstelėms esant diakinezės-I metafazės stadijoje. Atliekant citogenetinę analizę, XO-patelės nustatomos tik pagal kaulų čiulpų ląsteles, besidalijančias mitozės būdu ir turinčias tik 39 chromosomas.

## 1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

Nėra.

## 1.6. BANDYMO METODO APIBŪDINIMAS

*Pasiruošimas bandymui*

Bandomosios medžiagos ištirpinamos izotoniniame druskų tirpale. Vandenyje netirpios cheminės medžiagos ištirpinamos ar suspenduojamos, panaudojus atitinkamas priemones. Naudojami šviežiai paruošti bandomosios cheminės medžiagos tirpalai. Jei priemonė duodama kartu su bandomosios medžiagos doze, tai ji neturi trukdyti nei bandomajai cheminei medžiagai veikti, nei toksiniams poveikiams pasireikšti.

*Davimo būdas*

Paprastai bandomoji medžiaga duodama per į trachėją įvedamą vamzdelį arba injekuojant bandomąją medžiagą į pilvą. Medžiagą galima duoti ir kitais būdais.

*Eksperimentiniai gyvūnai*

Tam, kad palengvėtų kryžminimas bei citologinis patvirtinimas, šie eksperimentai atliekami su pelėmis. Specifinis pelių kamienas nėra būtinas. Tačiau vienam kamienui priklausančių gyvūnų vadoje vidutiniškai bei pastoviai turėtų būti daugiau nei aštuoni palikuonys.

Naudojami sveiki lytiškai subrendę gyvūnai.

*Gyvūnų skaičius*

Gyvūnų, būtinų bandymui atlikti, skaičius priklauso nuo spontaninės translokacijos dažnio bei mažiausio translokacijos sukėlimo greičio, kuris būtinas tam, kad būtų gaunamas teigiamas rezultatas.

Bandymas paprastai atliekamas analizuojant patinų  $F_1$  palikuonis. Tiriant gyvūnų, kuriems buvo duota konkreti bandomosios medžiagos dozė, grupę, reikėtų išanalizuoti mažiausiai 500 patinų  $F_1$  palikuonis. Jei bandomi patelių  $F_1$  palikuonys, bandymui atlikti reikia po 300 patinų bei patelių.

### Teigiamų ir neigiamų kontrolių naudojimas

Reikėtų remtis atitinkamais kontroliniais duomenimis, gautais atliekant bandymą ir vienu metu naudojant kontroles bei anksčiau atliktų bandymų metu naudotas kontroles. Kai galima susipažinti su toje pačioje laboratorijoje ką tik atliktų eksperimentų, naudojant teigiamas kontroles, gautais patenkinamais rezultatais, šiuos rezultatus galima naudoti vietoj teigiamos kontrolės, naudojamos tuo pačiu metu.

### Veikimo dozė

Bandymo metu paprastai naudojama pavienė ir pati didžiausia dozė, sukelianti silpniausiai pasireiškiančius toksinius poveikius, tačiau neįtakojanti elgsenos dauginimosi metu ar išgyvenimo. Siekiant nustatyti dozės ir atsako sąsają, reikėtų panaudoti dvi nedideles papildomas dozes. Netoksinių cheminių medžiagų atveju reikėtų naudoti pačią didžiausią dozę.

### Bandymo eiga

#### Veikimas ir poravimas

Veikti bandomąja medžiaga galima dvejopai. Dažniausiai bandomoji medžiaga duodama 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, registruojama palikuonių gimimo data, vados dydis bei palikuonių lytis. Visi vyriškos lyties palikuonys atjunkomi, o visi moteriškos lyties palikuonys pašalinami, nebent jie būtų naudojami eksperimento metu.

#### Translokacijos heterozigotiškumo bandymas

Galima naudotis vienu iš dviejų galimų metodų:

- $F_1$  palikuonių vaisingumo bandymas ir gyvūnų, kurie gali turėti translokacijas, identifikavimas citogenetinės analizės būdu,
- visų  $F_1$  vyriškos lyties palikuonių citogenetinė analizė, neatrenkant jų iš anksto pagal vaisingumą.

##### a) Vaisingumo bandymas

Sumažėjęs  $F_1$  gyvūno vaisingumas gali būti nustatomas, stebint vados gausą ir (ar) analizuojant patelių, kurios buvo naudojamos poravimui, gimdos turinį.

Atsižvelgiant į naudojamą pelių kamieną, reikia pasirinkti kriterijus, pagal kuriuos bus sprendžiama apie normalų ir sumažėjusį vaisingumą.

Vados dydžio stebėjimas: Bandomieji  $F_1$  patinai yra laikomi atskirai arba nuo tame pačiame eksperimente naudojamų arba nuo visos pelių kolonijos patelių. Narvai stebimi kasdien, pradedant nuo 18 dienos, praėjusios po suporavimo. Patelėms atsivedus  $F_2$  palikuonis, užregistruojamas vados dydis bei palikuonių, kurie po to pašalinami, lytis. Jei bandomi moteriškos lyties  $F_1$  palikuonys, tai mažos  $F_2$  vados bus bandomos vėliau. Translokacijos turinčios patelės identifikuojamos, atliekant translokacijos citogenetinę analizę, naudojant bet kurių jų vyriškos lyties palikuonį. XO patelės identifikuojamos pagal lyčių santykio jų palikuonių tarpe pokyčius – 1:1 (patinai/patelės) —  $\rightarrow$  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: Translokacijos turinčių gyvūnų vados dydis sumažėja dėl embrionų žūtis, todėl daug žuvusių implantų parodo, kad bandomieji gyvūnai turi translokacijas. Kiekvienas  $F_1$  patinas, kuris bus bandomas, suporuojamas su 2–3 patelėmis. Apvaisinimas nustatomas kiekvienos dienos rytą ieškant makšties kamščio susidarymo. Praėjus 14–16 dienų po apvaisinimo patelės numarinamos ir užregistruojami gyvi bei žuvę implantai, esantys gimdoje.

##### b) Citogenetinė analizė

Sėklidės paruošiamos, išdžiovinant jas ore. Gyvūnai, turintys translokacijas, identifikuojami pagal pirminių spermatocitų, esančių mejozės diakinezės-metafazės I stadijoje, multivalentinių chromosomų konfigūracijas. Nustačius šiuos multivalentinius darinius mažiausiai dviejose ląstelėse, galima teigti, kad bandomasis gyvūnas turi translokacijas.

Jei nebuvo vykdoma atranka pagal kryžminimus, tai visi  $F_1$  patinai tiriami citogenetiniu aspektu. Reikia mikroskopiskai iširti mažiausiai 25 vieno patino ląsteles, esančias diakinezės-metafazės I stadijoje. Jei įtariama, kad  $F_1$  patinuose, turinčiuose menkas sėklides bei  $F_1$  XO patelėse mejozė nutraukiama, prieš prasidedant diakinezei, reikia iširti šių patinų spermatogonijų arba kaulų čiulpų ląstelių bei patelių kaulų čiulpų ląstelių mitozines metafazines chromosomas. Mažiausiai dešimtyje iširtų 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 tikiai atliekant mitozinių chromosomų juostų elektroforezinę analizę. Jei tirtos patelės atveju bent 10 mitozės atvejų užregistruojamos 39 chromosomos, tokia patelė laikoma XO.

## 2. DUOMENYS

Duomenys turėtų būti pateikiami lentelėse.

Atliekant kiekvieną poravimą, registruojamas vidutinis vados dydis bei lyčių santykis, pradedant nuo tėvų poravimo ir baigiant palikuonių gimimu bei jų atjunkymu.

Įvertinant  $F_1$  gyvūnų vaisingumą, pateikiamas vidutinis vados dydis normalių poravimų atveju bei atskirų  $F_1$  gyvūnų, turinčių translokacijas, vadų dydžiai. Tiriant gimdos turinį, pateikiamas vidutinis gyvų bei žuvusių implantų skaičius normalių poravimų atveju ir atskirų  $F_1$  gyvūnų, turinčių translokacijas, gyvų bei žuvusių transplantų skaičius kiekvieno poravimo atveju.

Atliekant ląstelių, esančių diakinezės- metafazės I stadijoje, citogenetinę analizę, nurodomas multivalentinių chromosomų konfigūracijų tipų kiekis bei absoliutus ląstelių, naudotų, tiriant kiekvieną translokacijas turintį gyvūną, absoliutus skaičių.

Tiriant sterilius  $F_1$  gyvūnus, pateikiamas absoliutus poravimų skaičius bei poravimo periodo trukmė. Nurodomi sėklidžių svoriai bei citogenetinės analizės duomenys.

Tiriant XO pateles, nurodomas vidutinis vados dydis, lyčių santykis  $F_2$  palikuonių tarpe bei citogenetinės analizės duomenys.

Jei numanomi  $F_1$  gyvūnai, turintys translokacijas, tiriami pagal vaisingumą, taip atrenkant juos iš anksto, pateikiamos lentelės, kuriose nurodoma, kiek iš tų  $F_1$  gyvūnų yra heterozigotų pagal translokacijas.

Pateikiami eksperimentų, kurių metu naudojamos teigiamos bei neigiamos kontrolės, duomenys.

## 3. ATASKAITA

### 3.1. BANDYMO ATASKAITA

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

- pelių kamienas, gyvūnų amžius, gyvūnų, paveiktų bandomąja medžiaga, kūno masė,
- kiekvienos lyties tėvinių gyvūnų skaičius bandomojoje bei kontrolinėje grupėse,
- bandymo sąlygos, išsamus veikimo aprašymas, dozės, tirpikliai, suporavimo tvarkaraštis,
- kiekvienos patelės atsivestų palikuonių skaičius bei lytis, palikuonių, užaugintų translokacijos bandymams, skaičius bei lytis,
- translokacijos bandymo laikas bei kriterijai,
- gyvūnų, turinčių translokacijas, išsamus apibūdinimas bei jų skaičius, įskaitant kryžminimo duomenis bei gimdos turinio analizės rezultatus, jei reikia,
- citogenetinės procedūros ir mikroskopinės analizės apibūdinimas, pageidautina, pateikiant schemas,
- statistinis įvertinimas,

— rezultatų aptarimas,

— rezultatų aiškinimas.

### 3.2. ĮVERTINIMAS IR AIŠKINIMAS

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

### 4. NUORODOS

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

**B.26. POŪMIS TOKSIŠKUMAS PER VIRŠKINAMĄJĮ TRAKTĄ. 90 DIENŲ KARTOTINIŲ DOZIŲ TOKSIŠKUMO GRAUŽIKAMS BANDYMAS****1. METODAS**

Šis poūmio toksiškumo per virškinamąjį traktą bandymo metodas yra OECD TG 408 (1998) kopija.

**1.1. ĮVADAS**

Vertinant cheminių medžiagų toksines savybes, galima atlikti kartotinių dozių poūmio toksiškumo per virškinamąjį traktą bandymą, prieš tai gavus pradinę informaciją apie jos toksiškumą per ūmaus ar 28 parų kartotinės dozės toksiškumo bandymus. Per 90 dienų bandymą gaunama informacijos apie galimus pavojus sveikatai, galinčius kilti po kartotinio veikimo ilgą laikotarpį, trunkantį nuo atjunkymo iki visiško subrendimo. Atlikus šį bandymą gaunama informacijos apie svarbesnius toksinius poveikius, paveiktus organus ir kaupimosi galimybę, taip pat duomenų apie nepastebėto neigiamo poveikio ribą (NOAEL), kuria galima pasinaudoti parenkant dozes lėtinio poveikio bandymui ir nustatant žmonių sąlyčio su konkrečia chemine medžiaga saugos kriterijus.

Šiame metode papildomas dėmesys skiriamas sukeliamiems neurologiniams pakitimams, taip pat gaunama žinių, ar paveiktos imunologinė ir dauginimosi sistemos. Pabrėžiamas gyvūnų kruopščių klinikinių stebėjimų būtinumas, kad būtų gauta kuo daugiau informacijos. Šiuo bandymu turėtų būti nustatomos cheminės medžiagos, galinčios sukelti neurotoksinį poveikį, paveikti imunologinę sistemą ar dauginimosi organus, o tai būtų pagrindas toliau tęsti išsamius tyrimus.

Taip pat žr. Bendrojo įvado B dalį.

**1.2. APIBRĖŽTYS**

**Dozė** – gyvūnui duotas bandomosios medžiagos kiekis. Dozė išreiškiama bandomosios medžiagos mase bandomojo gyvūno masės vienetui (pvz., mg/kg), ar pastovia koncentracija maiste (ppm).

**Dozavimas** – bendras terminas, apimantis dozės dydį, jos dažnį ir dozavimo trukmę.

**NOAEL** – termino „nepastebėto neigiamo poveikio riba“ (No observed adverse effect level) santrumpa, tai yra didžiausia dozė, kai nepastebimas neigiamas su veikimu chemine medžiaga susijęs poveikis.

**1.3. BANDYMO METODO PRINCIPAS**

Kasdien kelioms bandomųjų gyvūnų grupėms per virškinamąjį traktą duodamos skirtingos bandomosios medžiagos dozės, vienai grupei 90 parų laikotarpiu duodama vieno dydžio dozė. Medžiagos davimo laikotarpiu atidžiai stebima, ar gyvūnams pasireiškia toksiškumo požymiai. Darant bandymą nugaišę ar numarinti gyvūnai skrodžiami, o baigus bandymą išlikę gyvūnai taip pat numarunami ir skrodžiami.

**1.4. BANDYMO METODO APRAŠYMAS****1.4.1. Gyvūnų paruošimas**

Turi būti imami sveiki gyvūnai, bent penkias paras aklimatizuoti laboratorijos sąlygomis ir dar nenaudoti kitiems bandymams. Aprašoma bandymo gyvūnų rūšis, veislė, šaltinis, lytis, masė ir (ar) amžius. Gyvūnai į kontrolines ir bandomąsias grupes turi būti paskirstomi atsitiktinai. Narveliai turi būti pastatomi taip, kad kuo mažiau pasireikštų neigiama jų išdėstymo įtaka. Kiekvienam gyvūnui turi būti paskirtas unikalus identifikacijos numeris.

**1.4.2. Dozių ruošimas**

Bandomoji medžiaga duodama per zondą arba su maistu ar geriamuoju vandeniu. Dozės davimo per virškinamąjį traktą būdas priklauso nuo bandymo tikslo ir bandomosios medžiagos fizikinių ir cheminių savybių.

Jei būtina, bandomajai medžiagai ištirpdyti arba suspenduoti naudojamas atitinkamas nešiklis. Rekomenduojama naudoti, jei įmanoma, vandeninį tirpalą (suspensiją, emulsiją), toliau pirmenybė teikiama aliejiniam tirpalui (emulsijai, suspensijai) (pvz., kukurūzų aliejaus) ir tik po jų svarstyti kitų nešiklių tirpalai. Turi būti žinomos visų nešiklių, išskyrus vandenį, toksiškumo charakteristikos. Turi būti nustatytas bandomosios medžiagos stabilumas dozės davimo sąlygomis.

#### 1.4.3. **Bandymo sąlygos**

##### 1.4.3.1. *Bandomieji gyvūnai*

Geriau tinka žiurkės, tačiau galima naudoti ir kitus graužikus, pvz., peles. Reikėtų naudoti gerai žinomų laboratorinių veislių jaunos suaugusius gyvūnus. Patelės turi būti dar neturėjusios palikuonių ir neapvaisintos. Dozavimas turėtų būti pradėtas kuo anksčiau po atjunkymo, bet kokiu atveju ne vėliau negu gyvūnams sukanka devynios savaitės. Gyvūnų masės skirtumai prieš bandymo pradžią turi būti kuo mažesni ir neviršyti  $\pm 20\%$  kiekvienos lyties vidutinės masės. Jei tai yra pradinis bandymas prieš ilgalaikį lėtinio toksiškumo bandymą, abiem bandymams turi būti naudojami tos pačios veislės ir to paties šaltinio gyvūnai.

##### 1.4.3.2. *Skaičius ir lytis*

Kiekvienai dozei turi būti naudojama bent 20 gyvūnų (10 patelių ir 10 patinų). Jei planuojami tarpiniai skrodimai, gyvūnų skaičius turi būti padidintas tiek, kiek jų numatyta numarinti iki bandymo pabaigos. Remiantis ankstesnėmis žiniomis apie cheminę medžiagą ar labai panašių savybių medžiagą, galima į kontrolinio bandymo ir į didžiausios dozės grupę papildomai įtraukti pagalbinę 10 gyvūnų grupę (po penkis kiekvienos lyties), kad pasibaigus veikimo laikotarpiui galima būtų stebėti visų toksiškumo požymių grįžtamumą ar išlikimą. Šio laikotarpio po veikimo trukmė turėtų būti atitinkamai nustatyta atsižvelgiant į stebimus poveikius.

##### 1.4.3.3. *Dozės*

Naudojamos bent trijų dydžių dozės ir vienas lygiagretus kontrolinis bandinys, išskyrus atvejus, kai daromas ribinis bandymas (žr. 1.4.3.4). Dozių dydžiai gali būti pagrįsti kartotinių dozių ar diapazono nustatymo bandymų rezultatais ir turi būti atsižvelgta į visus esamus toksikologinius ir toksikokinetinius duomenis apie bandomąją medžiagą ar giminingas medžiagas. Jei bandomosios medžiagos fizikinis ir cheminis pobūdis ar biologinis poveikis dozės neriboja, didžiausia dozė turi būti pasirinkta tokia, kad gyvūnui būtų sukeltas toksinis poveikis, bet jis nežūtų ar nepatirtų didelių kančių. Mažėjančių dozių seka turi būti pasirinkta taip, kad būtų pastebėtas bet koks dozės sukeltas atsakas, o esant mažiausiai dozei nebūtų pastebėta jokio neigiamo poveikio (NOAEL). Mažėjančios dozės turėtų būti du-keturis kartus viena už kitą mažesnės, ir dažnai vietoj didelių dozių intervalų (pvz., kai skirtumas tarp jų yra 6–10 kartų) geriau naudoti papildomą ketvirtą bandymų grupę.

Kontrolinę grupę sudaro neveikiamų gyvūnų grupė arba nešiklių gaunanti kontrolinė grupė, jei bandomajai medžiagai duoti naudojamas nešiklis. Išskyrus bandomosios medžiagos davimą, su kontrolinės grupės gyvūnais turi būti elgiamasi lygiai taip, kaip su bandymo grupių gyvūnais. Jei naudojamas nešiklis, kontrolinės grupės gyvūnai gauna didžiausią nešiklio tūrį. Jei bandomoji medžiaga duodama su maistu ir dėl to gyvūnai suvartoja mažiau maisto, gali būti naudinga turėti lygiagrečiai maitinamą kontrolinę grupę, kad būtų galima nustatyti, ar maisto vartojimo sumažėjimas yra dėl apetito stokos ar dėl toksikologinių pokyčių pagal bandymo modelį.

Reikėtų atkreipti dėmesį į šias nešiklio ir kitų priedų charakteristikas: poveikį bandomosios medžiagos absorbcijai, pasiskirstymui, metabolizmui ar sulaikymui; poveikį bandomosios medžiagos cheminėms savybėms, galintiems pakeisti jos toksiškumo charakteristikas; ir poveikį maisto ar vandens vartojimui ar gyvūnų mitybos būklei.

##### 1.4.3.4. *Ribinis bandymas*

Jei, taikant šiam bandymui aprašytas metodikas, vienos dozės, atitinkančios bent 1 000 mg/kg kūno masės/parai, bandymas nesukelia jokio pastebimo neigiamo poveikio ir jei toksiškumas nenumatomas atsižvelgiant į struktūriškai giminingų medžiagų duomenis, visas trijų dozių bandymas gali būti laikomas nebūtinu. Toks ribinis bandymas netaikomas tais atvejais, kai atsižvelgiant į žmonių sąlytį su medžiaga reikia naudoti didesnio dydžio dozę.

#### 1.5. **BANDYMO EIGA**

##### 1.5.1. **Dozavimas**

Bandomosios medžiagos dozė 90 parų laikotarpiu gyvūnams duodama kasdien visus septynias dienas per savaitę. Bet kurį kitą režimą, pvz., penkių dienų per savaitę, reikia pagrįsti. Kai bandomoji medžiaga duodama per zondą, gyvūnams turėtų būti duodama tik viena dozė naudojant skrandžio zondą ar tinkamą intubacinį vamzdelį. Didžiausias gyvūnui duodamas vienkartinis skysčio tūris priklauso nuo bandomojo gyvūno

dydžio. Tūris neturėtų būti didesnis kaip 1 ml/100 g kūno masės, išskyrus vandeninius tirpalus, kurių galima duoti po 2 ml/100 g kūno masės. Išskyrus dirginančias ar esdinančias medžiagas, kurių didesnės koncentracijos paprastai sukelia dirginantį poveikį, tirpalo tūrio svyravimai turi būti kuo mažesni: koncentracija pakoreguojama taip, kad visų dozių tūris būtų toks pats.

Jei medžiagos duodamos su maistu ar geriamuoju vandeniu, svarbu garantuoti, kad naudojami bandomosios medžiagos kiekiai netrikdytų normalaus mitybos režimo ar vandens balanso. Bandomąją medžiagą duodant su maistu, galima naudoti pastovią koncentraciją maiste (ppm) ar pastovią dozę pagal gyvūno kūno masę; naudota alternatyva turi būti nurodyta. Medžiagą įleidžiant per zondą, dozė turėtų būti duodama kasdien panašiu laiku ir prirėkus pakoreguojama pastoviam dozės dydžiui pagal gyvūno kūno masę palaikyti. Jei 90 parų bandymas daromas kaip pradinis prieš ilgalaikį lėtinio toksiškumo bandymą, abiem bandymams turi būti naudojamas panašus maistas.

### 1.5.2. Stebėjimai

Stebėjimo trukmė turi būti ne mažesnė kaip 90 parų. Pagalbinės grupės gyvūnai, skirti paskesniems stebėjimams, atitinkamą laiką turi būti niekaip neveikiami, kad būtų galima konstatuoti toksinių poveikių išlikimą ar atsigavimą po jų.

Bendras klinikinis stebėjimas turi būti atliekamas bent kartą per dieną, geriau kasdien tuo pačiu laiku, atsižvelgiant į intensyviausią numatomo poveikio pasireiškimo laiką po medžiagos davimo. Turi būti registruojama gyvūnų klinikinė būseną. Bent du kartus per dieną, paprastai kiekvienos dienos ryte ir vakare, visi gyvūnai apžiūrimi siekiant nustatyti liguistumo ir gaištumo požymius.

Bent vieną kartą prieš pirmąjį veikimą (kad būtų galima palyginti to paties gyvūno duomenis) ir po to kartą per savaitę visiems gyvūnams turi būti daromi išsamūs klinikiniai tyrimai. Šie tyrimai turi būti daromi ne pačiame gyvūno narvelyje, o geriau standartiškai įrengtoje vietoje ir kiekvieną kartą panašiu laiku. Jie turi būti kruopščiai registruojami, geriausiai naudojant bandymų laboratorijos aiškiai nustatytą vertinimo balais sistemą. Turi būti imami priemonių, garantuojančių kuo mažesnę stebėjimo sąlygų kitimą. Pastebėti simptomai turi apimti, jais neapsiribojant, odos, kailio, akių, gleivinių, sekrecijų ir ekskrecijų dažnį ir autonominių aktyvumą (pvz., ašarojimą, plaukų pašiausimą, vyzdžių dydį, neįprastą kvėpavimą). Taip pat turi būti registruojami eisenos pokyčiai, laikysena ir reakcija į elgimąsi su gyvūnu (angl. *handling*), kloniniai ar toniniai judesiai, stereotipai (pvz., per dažnas kūno prisžiūrėjimas, nuolatinis sukimasis ratu) ar keistas elgesys (pvz., savęs žalojimas, vaikščiojimas atbulomis) (1).

Prieš pradėdam duoti bandomąją medžiagą ir baigiant bandymą turi būti daromas, pageidautina visų, bet jei neįmanoma, tai bent didžiausios dozės ir kontrolinės grupių gyvūnų oftalmologinis tyrimas naudojant oftalmoskopą ar lygiavertę tinkamą įrangą. Jei nustatomi akių pakitimai, turi būti ištirti visi gyvūnai.

Baigiantis veikimo laikui, bet 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. Kita išsami informacija apie tinkamus metodus pateikiama atitinkamose nuorodose. Tačiau galima taikyti šių nuorodų metodams alternatyvius metodus.

Bandymo pabaigoje numatyti funkciniai stebėjimai gali būti nevykdomi, jei yra kitų bandymų funkciniai stebėjimų duomenys, o kasdienių klinikinių stebėjimų metu nepastebėta jokių funkcinų sutrikimų.

Išimtinu atveju funkcinų stebėjimų galima taip pat nedaryti grupėms, kurių toksiškumo požymiai yra tokie ryškūs, kad jie labai trukdytų atlikti funkcinus stebėjimus.

#### 1.5.2.1. Kūno masė ir maisto/vandens suvartojimas

Visi gyvūnai turi būti sveriami bent kartą per savaitę. Suvartojamo maisto kiekis turi būti matuojamas bent kas savaitę. Jei bandomoji medžiaga duodama su geriamuoju vandeniu, bent kas savaitę turi būti nustatomas ir suvartojamo vandens kiekis. Suvartojamo vandens kiekį rekomenduojama matuoti ir tuo atveju, kai bandomąją medžiagą duodant su maistu ar per zondą gali pakisti vandens suvartojimas.

#### 1.5.2.2. Hematologiniai ir klinikiniai biocheminiai tyrimai

Kraujo bandiniai turi būti imami iš nurodytos vietos ir prirėkus laikomi atitinkamomis sąlygomis. Baigiantis bandymo laikotarpiui kraujas paaimamas prieš pat gyvūnų numarimą arba numarimo metu.

Bandymo laikotarpio pabaigoje arba kai imami tarpiniai kraujo bandiniai, turi būti daromi šie hematologiniai tyrimai: hematokrito vertė, hemoglobino koncentracija, eritrocitų skaičius, bendras leukocitų skaičius ir leukocitų formulė, trombocitų skaičius ir kraujo krešėjimo laiko/gebos matavimas.

Klinikiniai biocheminiai matavimai siekiant nustatyti pagrindinius toksinius poveikius audiniams, ypač inkstams bei kepenims, turi būti atliekami paėmus kraują prieš pat numarinant gyvūną ar numarinimo metu (išskyrus gaištančius ir (ar) numarintus darant bandymą). Panašiai kaip hematologiniams tyrimams, galima imti tarpinius bandinius klinikiniams biocheminiams bandymams. Rekomenduojama prieš kraujo ėmimą gyvūnų per naktį nešerti<sup>(1)</sup>. Analizuojant serumą ar plazmą turi būti nustatomi natrio ir kalio jonai, gliukozė, bendras cholesterolis, karbamidas, kraujo karbamido azotas, kreatininas, bendras baltymų ir albumino kiekis ir daugiau kaip du fermentai, rodantys poveikį kepenų ląstelėms (pvz., alaninaminotransferazė, aspartataminotransferazė, šarminė fosfatazė, gama glutamiltranspeptidazė ir sorbitoldehidrogenazė). Taip pat galima įtraukti papildomų fermentų (kepenų ar kitokios kilmės) ir tulžies rūgščių matavimus, kurie tam tikromis sąlygomis gali suteikti naudingos informacijos.

Neprivalomai paskutinę bandymo savaitę gali būti analizuojami šie nustatyti laiku paimtų šlapimo bandinių parametrai: išvaizda, tūris, osmolališkumas ar santykinis tankis, pH, baltymai, gliukozė ir kraujas ar kraujo ląstelės.

Be to, galima atlikti tyrimus bendrų audinių pakitimų serumo rodikliams nustatyti. Jei dėl žinomų bandomosios medžiagos savybių gali būti paveiktos susijusios medžiagų apykaitos kreivės arba įtariama, kad jos paveiktos, reikėtų daryti kalcio, fosforo, badavimo trigliceridų, specifinių hormonų, metemoglobino ir cholinesterazės analizes. Šios analizės turi būti atliekamos tam tikrų klasių cheminių medžiagų atžvilgiu arba dėl jų atlikimo turi būti sprendžiama konkrečiu atveju.

Apškritai bandymą reikia daryti lanksčiai, atsižvelgiant į gyvūnų rūšį ir stebimus ar numatomus konkrečios medžiagos poveikius.

Jei istorinių pradinių duomenų nepakanka, reikia apsvarstyti, ar hematologinius ir klinikinius parametrus reikia nustatyti prieš pradėdant dozavimą; paprastai prieš veikimą bandomąja medžiaga šių duomenų gauti nepatariama (7).

#### 1.5.2.3. *Bendroji nekroskopija*

Visiems bandymui naudotiems gyvūnams turi būti daroma visiška ir išsami bendroji nekroskopija, kurią sudaro kruopštus kūno išorės paviršiaus, visų angų, kaukolės, krūtinės ir pilvo ertmių bei jų turinio tyrimas. Visų gyvūnų kepenys, inkstai, antinksčiai, sėklidės, antseklidžiai, gimdos, kiaušidės, užkrūčio liaukos, blužnis, smegenys ir širdis (išskyrus nugaišusių ir (ar) numarintų bandymo metu) atskiriami nuo prilipusių audinių ir kuo greičiau sveriami švieži, kad neišdžiūtų.

Naudojant audiniui ir vėlesniam histopatologiniam tyrimui tinkamiausią fiksavimo terpę turi būti užkonservuojami šie audiniai: visi organai su makroskopiniais pakitimais, smegenys (tipiškos sritys, įskaitant didžiąsias smegenis, smegenėles ir kaulų čiulpus/Varoli tiltą), stuburo smegenys (trijų lygių: kaklo, vidurinio krūtinės ir juosmens), hipofizė, skydliaukė, prieskydinė liauka, užkrūčio liauka, stemplė, seilių liaukos, skrandis, plonosios ir storosios žarnos (įskaitant Peyerio plokšteles), kepenys, kasa, inkstai, antinksčiai, blužnis, širdis, trachėja ir plaučiai (konservuojant pripučiami fiksavimo terpės ir vėliau panardinami), aorta, lytinės liaukos, gimda, pagalbinių lyties organai, patelių pieno liaukos, prostata, šlapimo pūslė, tulžies pūslė (pelių), limfmazgiai (somatiniais poveikiams nustatyti geriau imti vieną limfmazgį dozės davimo kelyje, o kitą – toli nuo dozės patekimo kelio), periferiniai nervai (sėdmens ar blauzdkaulio) geriau prie pat raumens, kaulų čiulpų dalis (ir (ar) šviežiai išsiurbti kaulų čiulpai), oda ir akys (jei darant oftalmologinius tyrimus buvo pastebėti pakitimai). Klinikiniai ir kiti duomenys gali parodyti, jog būtina tirti papildomus audinius. Taip pat konservuojami visi organai, kurie pagal žinomas bandomosios medžiagos savybes gali būti jos paveikti.

#### 1.5.2.4. *Histopatologiniai tyrimai*

Turi būti daromi išsamūs histopatologiniai kontrolinių ir didelės dozės grupių gyvūnų užkonservuotų organų ir audinių tyrimai. Jei didelės dozės grupėje pastebima su veikimu bandomąja medžiaga susijusių pokyčių, ištiriami visų kitų dozių grupių gyvūnai.

Turėtų būti ištirti visi makroskopiniai pakitimai.

<sup>(1)</sup> Būtų geriau, jei prieš imant kraują kai kuriems serumo ir plazmos parametrams, ypač gliukozei, nustatyti gyvūnai nebūtų naktį maitinami. Pagrindinė priežastis – seriant neišvengiamai padidėja rezultatų sklaida, dėl to galėtų būti užslėpti mažiau pastebimi poveikiai ir todėl pasunkėtų rezultatų aiškinimas. Tačiau, kita vertus, badavimas per visą naktį gali turėti įtakos bendrajai gyvūnų medžiagų apykaitai ir sutrikdyti, ypač darant davimo su maistu tyrimus, kasdienį veikimą bandomąja medžiaga. Jei pasirenkamas gyvūnų badavimas per naktį, klinikiniai biocheminiai nustatymai turi būti daromi po tyrimo funkcinių stebėjimų.



Jei naudojama pagalbinė grupė, turi būti atliekamas tų audinių ir organų, kurie paveikti medžiagą gavusiose grupėse, histopatologinis tyrimas.

## 2. DUOMENYS IR ATASKAITA

### 2.1. DUOMENYS

Turi būti pateikti kiekvieno gyvūno duomenys. Papildomai visi duomenys turi būti apibendrinami lentelėse, kiekvienai bandymo grupei nurodomas bandymo pradžioje turėtų gyvūnų skaičius, darant bandymą rastų nugaišusių ar dėl gyvūnų gerovės priežasčių numarintų gyvūnų skaičius ir kiekvienos žūties ar numaravimo dėl gyvūnų gerovės priežasčių laikas, gyvūnų su toksiškumo požymiais skaičius, stebimų toksiškumo požymių aprašymas, įskaitant kiekvieno toksinio poveikio atsiradimo momentą, trukmę ir sunkumą, gyvūnų su organų pakitimais skaičių, pakitimų tipą ir gyvūnų su kiekvieno tipo pakitimais procentinę dalį.

Jei tinka, skaitmeniniai rezultatai turi būti įvertinti atitinkamu ir plačiai taikomu statistiniu metodu. Statistiniai metodai ir analizei skirti duomenys turi būti pasirinkti planuojant bandymą.

### 2.2. BANDYMO ATASKAITA

Bandymo ataskaitoje turi būti pateikta ši informacija:

#### 2.2.1. **Bandomoji medžiaga:**

- fizinė būseną, grynumas ir fizikinės bei cheminės savybės,
- tapatumas,
- nešiklis (jei naudojamas): nešiklio pasirinkimo pagrindimas, jei nešiklis ne vanduo.

#### 2.2.2. **Bandomieji gyvūnai:**

- naudota rūšis ir veislė,
- gyvūnų skaičius, amžius ir lytis,
- šaltinis, laikymo sąlygos, maistas ir t. t.,
- kiekvieno gyvūno masė bandymo pradžioje.

#### 2.2.3. **Bandymo sąlygos:**

- dozės dydžio parinkimo pagrindimas,
- išsami informacija apie bandomosios medžiagos/preparato ruošimą, jo dėjimą į maistą, gautą koncentraciją, preparato stabilumą ir vienalytiškumą,
- išsami informacija apie bandomosios medžiagos davimo būdą,
- tikrosios dozės (mg/kg kūno masės/parai) ir bandomosios medžiagos koncentracijos maiste/geriamajame vandenyje (ppm) perskaičiavimo į tikrąją dozę faktorius, jei naudojamas,
- išsami informacija apie maisto ir vandens kokybę.

#### 2.2.4. **Rezultatai:**

- kūno masė ir kūno masės pokyčiai,

- maisto ir vandens suvartojimas, jei aktualu,
- toksinio atsako duomenys pagal lytį ir dozę, įskaitant toksiškumo požymius,
- atliekant klinikinius stebėjimus pastebėto poveikio pobūdis, sunkumas ir trukmė (grįžtamojo pobūdžio ar ne),
- oftalmologinio tyrimo rezultatai,
- jutiminio aktyvumo, grybšnio jėgos ir motorinio aktyvumo vertinimai (jei yra),
- hematologiniai bandymai su atitinkamomis pamatinėmis vertėmis,
- klinikiniai biocheminiai bandymai su atitinkamomis pamatinėmis vertėmis,
- kūno masė bandymo pabaigoje, organų masė ir organo/kūno masės santykis,
- nekroskopijos duomenys,
- išsamus visų histopatologinio tyrimo rezultatų aprašymas,
- absorbcijos duomenys, jei yra,
- statistinis rezultatų apdorojimas, jei daromas.

Rezultatų aptarimas.

Išvados.

### 3. NUORODOS

- 1) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No. 60.
- 2) Tupper, D.E., Wallace, R.B. (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. *Acta Neurobiol. Exp.*, 40, p. 999–1003.
- 3) Gad, S.C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. *J.Toxicol. Environ. Health*, 9, p. 691–704.
- 4) Moser, V.C., Mc Daniel, K.M., Phillips, P.M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 108, p. 267–283.
- 5) Meyer O.A., Tilson h.A., Byrd W.C., Riley M.T. (1979). A Method for the Routine Assesment of Fore- and Hind- limb grip Strength of Rats and Mice. *Neurobehav. Toxivol.*, I, p. 233–236.
- 6) Crofton K.M., Howard J.L., Moser V.C., Gill M.W., Reiter L.W., Tilson h.A., MacPhail R.C. (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. *Neurotoxicol. Teratol.*, 13, p. 599–609.
- 7) Weingand K., Brown G., Hall R. *et al.* (1996). Harmonisation of Animal Clinic Pathology Testing in Toxicity and SAFETY Studies, *Fundam. & Appl. Toxicol.*, 29, p. 198–201.

**B.27. POŪMIS TOKSIŠKUMAS PER VIRŠKINAMĄJĮ TRAKTĄ. 90 DIENŲ KARTOTINIŲ DOZIŲ TOKSIŠKUMO NE GRAUŽIKAMS BANDYMAS****1. METODAS**

Šis poūmio toksiškumo per virškinamąjį traktą bandymo metodas yra OECD TG 409 (1998) kopija.

**1.1. ĮVADAS**

Vertinant cheminių medžiagų toksines savybes, galima atlikti kartotinių dozių poūmio toksiškumo per virškinamąjį traktą bandymą, prieš tai gavus pradinę informaciją apie jos toksiškumą per ūmaus ar 28 parų kartotinės dozės toksiškumo bandymus. Per 90 parų bandymą gaunama informacijos apie galimus pavojus sveikatai, galinčius kilti po kartotinio veikimo ilgą laikotarpį, trunkantį nuo atjunkymo iki visiško subrendimo. Atlikus šį bandymą gaunama informacijos apie svarbesnius toksinius poveikius, paveiktus organus ir kaupimosi galimybę, taip pat duomenų apie nepastebėto neigiamo poveikio ribą (NOAEL), kuria galima pasinaudoti parenkant dozes lėtinio toksiškumo bandymui ir nustatant žmonių sąlyčio su konkrečia chemine medžiaga saugos kriterijus.

Bandymo metodas leidžia identifikuoti cheminių medžiagų veikimo neigiamus poveikius ne graužikų rūšims ir turi būti taikomas tik:

- jei kitais bandymais nustatyti poveikiai rodo, kad paaiškinimui/apibūdinimui reikalinga kita, ne graužikų rūšis, ar
- jei toksikokinetiniai tyrimai rodo, kad tinkamiausias laboratorinio gyvūno pasirinkimas yra tam tikra ne graužikų rūšis, ar
- jei kitos specifinės priežastys pateisina ne graužikų naudojimą.

Taip pat žr. Bendrojo įvado B dalį.

**1.2. APIBRĖŽTYS**

**Dozė** – gyvūnui duotas bandomosios medžiagos kiekis. Dozė išreiškiama bandomosios medžiagos mase bandomojo gyvūno masės vienetui (pvz., mg/kg), ar pastovia koncentracija maiste (ppm)..

**Dozavimas** – bendras terminas, apimantis dozės dydį, jos dažnį ir dozavimo trukmę.

**NOAEL** – termino „nepastebėto neigiamo poveikio riba“ (No observed adverse effect level) santrumpa, tai yra didžiausia dozė, kai nepastebimas neigiamas su veikimu chemine medžiaga susijęs poveikis.

**1.3. BANDYMO METODO PRINCIPAS**

Kasdien kelioms bandomųjų gyvūnų grupėms per virškinamąjį traktą duodamos skirtingos bandomosios medžiagos dozės, vienai grupei 90 parų laikotarpiu duodama vieno dydžio dozė. Medžiagos davimo laikotarpiu atidžiai stebima, ar gyvūnams pasireiškia toksiškumo požymiai. Darant bandymą nugaish ar numarinti gyvūnai skrodžiami, o baigus bandymą išlikę gyvūnai taip pat numarunami ir skrodžiami.

**1.4. BANDYMO METODO APRAŠYMAS****1.4.1. Gyvūnų rūšies parinkimas**

Paprastai naudojama ne graužikų rūšis yra šuo, jis turi būti nustatytos veislės; dažnai naudojamas skalikas. Gali būti naudojami kiti gyvūnai, pvz., kiaulės, mažosios kiaulės. Primatai nerekomenduojami, tad jų naudojimas turi būti pagrįstas. Turi būti naudojami jauni ir sveiki gyvūnai. Jei naudojamas šuo, pradėti dozavimą geriau nuo 4–6 mėnesių ir ne vyresniam kaip devynių mėnesių amžiaus. Jei tai yra pradinis bandymas prieš ilgalaikį lėtinio toksiškumo bandymą, abiem bandymams turi būti naudojami tos pačios rūšies/veislės gyvūnai.

#### 1.4.2. Gyvūnų paruošimas

Turi būti imami sveiki, laboratorijos sąlygomis aklimatizuoti ir kitiems bandymams dar nenaudoti gyvūnai. Aklimatizavimo trukmė priklauso nuo pasirinktų rūšių ir jų šaltinio. Šunims ar specialiai šiuo tikslu auginoms kiaušinėms iš vietinės kolonijos rekomenduojama penkių parų aklimatizacija, o jei gyvūnai yra iš išorinių šaltinių – bent dviejų savaičių aklimatizacija. Aprašoma bandomųjų gyvūnų rūšis, veislė, šaltinis, lytis, masė ir (ar) amžius. Gyvūnai į kontrolines ir veikimo medžiaga grupes turi būti paskirstomi atsitiktinai. Narveliai turi būti išdėstomi taip, kad kuo mažiau pasireikštų pastatymo vietos įtaka. Kiekvienam gyvūnui turi būti paskirtas tik vienas identifikacijos numeris.

#### 1.4.3. Dozių paruošimas

Bandomoji medžiaga duodama su maistu ar geriamuoju vandeniu, per zondą arba kapsulėmis. Dozės davimo būdas priklauso nuo bandymo tikslo ir bandomosios medžiagos fizikinių ir cheminių savybių.

Jei būtina, bandomajai medžiagai ištirpinti arba suspenduoti naudojamas atitinkamas nešiklis. Visų pirma rekomenduojamas vandeninis tirpalas arba suspensija, po jo pirmenybė teikiama aliejiniam tirpalui arba suspensijai (pvz., kukurūzų) ir tik po jų galimi kitų nešiklių tirpalai. Naudojamo kito nešiklio nei vanduo toksinės savybės turi būti žinomos. Turėtų būti nustatytas bandomosios medžiagos stabilumas nešiklyje.

#### 1.5. BANDYMO EIGA

##### 1.5.1. Gyvūnų skaičius ir lytis

Kiekvienai dozei turi būti naudojami bent aštuoni gyvūnai (keturios patelės ir keturi patinai). Jei planuojami tarpiniai skrodimai, gyvūnų skaičius turi būti padidintas tiek, kiek gyvūnų numatyta numarinti iki bandymo pabaigos. Baigus bandymą gyvūnų skaičius turi būti toks, kad būtų galima tinkamai įvertinti medžiagos toksinį poveikį. Remiantis ankstesnėmis žiniomis apie cheminę medžiagą ar labai panašių savybių medžiagą, galima būtų numatyti į kontrolinio bandymo ir į didžiausios dozės grupę papildomai įtraukti po pagalbinę aštuonių gyvūnų grupę (po keturis kiekvienos lyties), kurios pasibaigus veikimo medžiaga laikotarpiui būtų stebimos siekiant nustatyti, ar toksiniai poveikiai yra grįžtamieji, ar išliekamieji. Šio laikotarpio po veikimo medžiaga trukmė turėtų būti tinkamai nustatyta atsižvelgiant į stebimus poveikius.

##### 1.5.2. Dozavimas

Naudojamos bent trijų dydžių dozės ir viena lygiagreti kontrolė grupė, išskyrus atvejus, kai daromas ribinis bandymas (žr. 1.5.3). Dozių dydžiai gali būti pagrįsti kartotinių dozių ar diapazono nustatymo bandymų rezultatais, ir turi būti atsižvelgta į visus esamus toksikologinius ir toksikokinetinius duomenis apie bandomąjį junginį ar giminingas chemines medžiagas. Jei bandomosios medžiagos fizikinis ir cheminis pobūdis ar biologinis poveikis dozės neriboja, didžiausia dozė turi būti pasirinkta tokia, kad gyvūnui būtų sukeltas toksinis poveikis, bet jis nežūtų ar nepatirtų didelių kančių. Mažėjančių dozių seka turi būti pasirinkta taip, kad būtų pastebėtas bet koks dozės sukeltas atsakas, o esant mažiausiai dozei nebūtų pastebėta jokie neigiamo poveikio (NOAEL). Mažėjančios dozės turėtų būti du-keturis kartus viena už kitą mažesnės, ir dažnai vietoj didelių dozių intervalų (pvz., kai skirtumas tarp jų yra 6–10 kartų) geriau naudoti papildomą ketvirtą bandymų grupę.

Kontrolinę grupę sudaro neveikiamų gyvūnų grupė arba nešiklių gaunanti kontrolinė grupė, jei bandomajai medžiagai duoti naudojamas nešiklis. Išskyrus bandomosios medžiagos davimą, su kontrolinės grupės gyvūnais turi būti elgiamasi lygiai taip, kaip su bandymo grupių gyvūnais. Jei naudojamas nešiklis, kontrolinės grupės gyvūnai gauna didžiausią nešiklio tūrį. Jei bandomoji medžiaga duodama su maistu ir dėl to gyvūnai suvartoja mažiau maisto, gali būti naudinga turėti lygiagrečiai maitinamą kontrolinę grupę, kad būtų galima nustatyti, ar maisto vartojimo sumažėjimas yra dėl apetito stokos ar dėl toksikologinių pokyčių pagal bandymo modelį.

Reikėtų atkreipti dėmesį į šias nešiklio ir kitų priedų charakteristikas: poveikį bandomosios medžiagos absorbcijai, pasiskirstymui, metabolizmui ar sulaukymui; poveikį bandomosios medžiagos cheminėms savybėms, galintiems pakeisti jos toksiškumo charakteristikas; ir poveikį maisto ar vandens vartojimui ar gyvūnų mitybos būklei.

##### 1.5.3. Ribinis bandymas

Jei, taikant šiam bandymui aprašytas metodikas, vienos dozės, atitinkančios bent 1 000 mg/kg kūno masės/parai, bandymas nesukelia jokio pastebimo neigiamo poveikio ir jei toksiškumas nenumatomas atsižvelgiant į struktūriškai giminingų medžiagų duomenis, visas trijų lygių dozės bandymas gali būti laikomas nebūtinu. Toks ribinis bandymas netaikomas tais atvejais, kai atsižvelgiant į žmonių sąlytį su medžiaga reikia naudoti didesnio dydžio dozę.

#### 1.5.4. Dozių davimas

Bandomosios medžiagos dozė 90 parų laikotarpiu gyvūnams duodama kasdien visas septynias dienas per savaitę. Bet kurį kitą režimą, pvz., penkių dienų per savaitę, reikia pagrįsti. Kai bandomoji medžiaga duodama per zondą, gyvūnams turėtų būti duodama tik viena dozė naudojant skrandžio zondą ar tinkamą intubacinį vamzdelį. Didžiausias gyvūnui duodamas vienkartinis skysčio tūris priklauso nuo bandymų gyvūno dydžio. Paprastai tūris turėtų būti kuo mažesnis. Išskyrus dirginančias ar esdinančias medžiagas, kurių didesnės koncentracijos paprastai sukelia dirginantį poveikį, tirpalo tūrio svyravimai turi būti kuo mažesni: koncentracija pakoreguojama taip, kad visų dozių tūris būtų toks pats.

Jei medžiagos duodamos su maistu ar geriamuoju vandeniu, svarbu garantuoti, kad naudojami bandomosios medžiagos kiekiai netrikdytų normalaus mitybos režimo ar vandens balanso. Bandomąją medžiagą duodant su maistu, galima naudoti pastovią koncentraciją maiste (ppm) ar pastovią dozę pagal gyvūno kūno masę; naudota alternatyva turi būti nurodyta. Medžiagą įleidžiant per zondą ar duodant kapsulę, dozė turėtų būti duodama kasdien panašiu laiku ir prireikus pakoreguota pastoviam dozės lygiui pagal gyvūno kūno masę palaikyti. Jei 90 parų bandymas daromas kaip pradinis bandymas prieš ilgalaikį lėtinio toksiškumo bandymą, abiem bandymams turi būti naudojamas panašus maistas.

#### 1.5.5. Stebėjimai

Stebėjimo trukmė turi būti ne mažesnė kaip 90 parų. Pagalbinės grupės gyvūnai, skirti paskesniems stebėjimams, atitinkamą laiką turi būti niekaip neveikiami, kad būtų galima konstatuoti toksinių poveikių išlikimą ar atsigvimą po jų.

Bendras klinikinis stebėjimas turi būti atliekamas bent kartą per dieną, geriau kasdien tuo pačiu laiku, atsižvelgiant į intensyviausią numatomo poveikio pasireiškimo laiką po medžiagos davimo. Turi būti registruojama gyvūnų klinikinė būseną. Bent du kartus per dieną, paprastai kiekvienos dienos ryte ir vakare, visi gyvūnai apžiūrimi siekiant nustatyti liguistumo ir gaištamumo požymius.

Bent vieną kartą prieš pirmąjį veikimą (kad būtų galima palyginti to paties gyvūno duomenis), ir po to kartą per savaitę visiems gyvūnams turi būti daromi išsamūs klinikiniai tyrimai. Šie tyrimai turi būti daromi ne pačiame gyvūno narvelyje, o geriau standartiškai įrengtoje vietoje ir kiekvieną kartą panašiu laiku. Turi būti imamos 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, plaukų pašiaušimą, vyzdžių dydį, neįprastą kvėpavimą). Taip pat turi būti registruojami eisenos pokyčiai, laikysena ir reakcija į elgesį su gyvūnu (angl. *handling*), kloniniai ar toniniai judesiai, stereotipai (pvz., per dažnas kūno prisžiūrėjimas, nuolatinis sukimasis ratu) ar keistas elgesys.

Prieš pradėdant duoti bandomąją medžiagą ir baigiant bandymą turi būti daromas, pageidautina visų, bet jei neįmanoma, tai bent didžiausios dozės ir kontrolinės grupių gyvūnų oftalmologinis tyrimas naudojant oftalmoskopą ar lygiavertę tinkamą įrangą. Jei nustatomi akių pakitimai, turi būti ištirti visi gyvūnai.

##### 1.5.5.1. Kūno masė ir maisto/vandens suvartojimas

Visi gyvūnai turi būti sveriami bent kartą per savaitę. Suvartojamo maisto kiekis turi būti matuojamas bent kas savaitę. Jei bandomoji medžiaga duodama su geriamuoju vandeniu, bent kas savaitę turi būti nustatomas ir suvartojamo vandens kiekis. Suvartojamo vandens kiekį rekomenduojama matuoti ir tuo atveju, kai bandomąją medžiagą duodant su maistu ar per zondą gali pakisti vandens suvartojimas.

##### 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 paaimamas prieš pat gyvūnų numarimą arba numaravimo metu.

Bandymo pradžioje, po to arba kas mėnesį, arba vieną kartą bandymo viduryje ir galiausiai bandymo pabaigoje turi būti daroma hematologinė analizė, įskaitant hemoglobino koncentraciją, eritrocitų skaičių, bendrą leukocitų skaičių ir leukocitų formulę, trombocitų skaičių ir kraujo krešėjimo gebos, pvz., krešėjimo laiko, protrombino laiko ar trombolastino laiko, matavimą.

Klinikiniai biocheminiai matavimai tiriant pagrindinius toksinius poveikius audiniams, ypač inkstams bei kepenims, turi būti atliekami paėmus kraują prieš pat numarinant gyvūną ar numaravimo metu (išskyrus gaištančius ir (ar) numarintus darant bandymą) pradėdant bandymą, po to arba kas mėnesį, arba vieną kartą bandymo viduryje ir galiausiai bandymo pabaigoje. Svarstytinios tyrimų sritys: elektrolitų pusiausvyrą, angliavandenių apykaita ir kepenų bei inkstų funkcijos. Konkrečių tyrimų pasirinkimui įtakos turės bandomosios medžiagos veikimo būdų stebėjimas. Prieš kraujo ėmimą gyvūnai turi būti nemaitinami gyvūno rūšį atitinkanti

laiką. Rekomenduojama nustatyti kalcį, fosforą, chloridus, natrij, kalį, badavimo gliukozę, alaninaminotransferazę, aspartataminotransferazę, ornitindekarboksilazę, gama glutamiltranspeptidazę, karbamido azotą, albuminą, kraujo kreatininą, bendrą bilirubiną ir bendrą serumo baltymų kiekį.

Šlapimą reikia tirti bent pradedant bandymą, per bandymo vidurį ir galiausiai bandymo pabaigoje analizuojant nustatytu laiku paimtus bandinius. Šlapimo analizė apima išvaizdą, tūrį, osmoliališumą 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, svarstyti tyrimai bendrų audinių pakitimų žymekliams nustatyti. Kitos analizės, kurių gali prireikti norint tinkamai įvertinti medžiagos toksiškumą, apima lipidų, hormonų, rūgščių ir šarmų pusiausvyros, metemoglobino ir cholinesterazės inhibavimo analizę. Galima naudoti papildomus klinikinius biocheminius tyrimus, jei būtina išplėsti stebimų poveikių tyrimą. Šios analizės turi būti atliekamos tam tikrų klasių cheminių medžiagų atžvilgiu arba dėl jų atlikimo turi būti sprendžiama konkrečiu atveju.

Apškritai bandymą reikia daryti lanksčiai, atsižvelgiant į gyvūnų rūšį ir stebimus ar numatomus konkrečios medžiagos poveikius.

#### 1.5.5.3. *Bendroji nekroskopija*

Visiems bandymui naudotiems gyvūnams daroma visiška ir išsami bendroji nekroskopija, kurią sudaro kruopštus kūno išorės paviršiaus, visų angų, kaukolės, krūtinės ir pilvo ertmių bei jų turinio tyrimas. Visų gyvūnų kepenys su tulžies pūsle, inkstai, antinksčiai, sėklidės, antiseklidžiai, kiaušidės, gimdos, skydliaukė (su prieskydine liauka), užkrūčio liaukos, blužnis, smegenys ir širdis (išskyrus nugaišusių ir (ar) numarintų bandymo metu) atskiriami nuo prilipusių audinių ir kuo greičiau sveriami švieži, kad neišdžiūtų.

Naudojant audiniui ir vėlesniam histopatologiniam tyrimui tinkamiausią fiksavimo terpę, turi būti užkonservuojami šie audiniai: visi organai su makroskopiniais pakitimais, smegenys (tipiškos sritys, įskaitant didžiąsias smegenis, smegenėles ir kaulų čiulpus/Varoli tiltą), stuburo smegenys (trijų lygių: kaklo, vidurinio krūtinės ir juosmens), hipofizis, akys, skydliaukė, prieskydine liauka, užkrūčio liauka, stemplė, seilių liaukos, skrandis, plonosios ir storosios žarnos (įskaitant Peyerio plokšteles), kepenys, tulžies pūslė, kasa, inkstai, antinksčiai, blužnis, širdis, trachėja ir plaučiai, aorta, lytinės liaukos, gimda, pagalbiniai lyties organai, patelių pieno liaukos, prostata, šlapimo pūslė, limfmazgiai (somatiniams poveikiams nustatyti geriau imti vieną limfmazgį dozės davimo kelyje, o kitą – toli nuo dozės davimo kelio), periferiniai nervai (sėdmens ar blauzdikaulio) geriau prie pat raumens, kaulų čiulpų dalis (ir (ar) šviežiai išsiurbti kaulų čiulpai) ir oda. Klinikiniai ir kiti duomenys gali parodyti, jog būtina tirti papildomus audinius. Taip pat konservuojami visi organai, kurie pagal žinomas bandomosios medžiagos savybes gali būti jos paveikti.

#### 1.5.5.4. *Histopatologiniai tyrimai*

Turi būti daromi išsamūs histopatologiniai kontrolinių ir didelės dozės grupių gyvūnų užkonservuotų organų ir audinių tyrimai. Jei didelės dozės grupėje pastebima su veikimu bandomąja medžiaga susijusių pokyčių, ištiriami visų kitų dozių grupių gyvūnai.

Turėtų būti ištirti visi makroskopiniai pakitimai.

Jei naudojama pagalbinė grupė, turi būti atliekamas tų audinių ir organų, kurie paveikti medžiagą gavusiose grupėse, histopatologinis tyrimas.

## 2. **DUOMENYS IR ATASKAITA**

### 2.1. **DUOMENYS**

Turi būti pateikti kiekvieno gyvūno duomenys. Papildomai visi duomenys turi būti apibendrinami lentelėse, kiekvienai bandymo grupei nurodomas bandymo pradžioje turėtų gyvūnų skaičius, darant bandymą rastų nugaišusių ar dėl gyvūnų gerovės priežasčių numarintų gyvūnų skaičius ir kiekvienos žūties ar numaravimo dėl gyvūnų gerovės priežasčių laikas, gyvūnų su toksiškumo požymiais skaičius, stebimų toksiškumo požymių aprašymas, įskaitant kiekvieno toksiškumo poveikio atsiradimo momentą, trukmę ir sunkumą, gyvūnų su organų pakitimais skaičių, pakitimų tipą ir gyvūnų su kiekvieno tipo pakitimais procentinę dalį.

Jei tinka, skaitmeniniai rezultatai turi būti įvertinti atitinkamu ir plačiai taikomu statistiniu metodu. Statistiniai metodai ir analizei skirti duomenys turi būti pasirinkti planuojant bandymą.

## 2.2. BANDYMO ATASKAITA

Bandymo ataskaitoje turi būti pateikta ši informacija:

### 2.2.1. **Bandomoji medžiaga:**

- fizikinė būseną, grynumas ir fizikinės ir cheminės savybės,
- tapatumas,
- nešiklis (jei naudojamas): nešiklio pasirinkimo pagrindimas, jei nešiklis ne vanduo.

### 2.2.2. **Bandomieji gyvūnai:**

- naudota rūšis ir veislė,
- gyvūnų skaičius, amžius ir lytis,
- šaltinis, laikymo sąlygos, maistas ir t. t.,
- kiekvieno gyvūno masė bandymo pradžioje.

### 2.2.3. **Bandymo sąlygos:**

- dozės dydžio parinkimo pagrindimas,
- išsami informacija apie bandomosios medžiagos/preparato ruošimą, jo dėjimą į maistą, gautą koncentraciją, preparato stabilumą ir vienalytiškumą,
- išsami informacija apie bandomosios medžiagos davimo būdą,
- tikrosios dozės (mg/kg kūno masės/parai) ir bandomosios medžiagos koncentracijos maiste/geriamajame vandenyje (ppm) perskaičiavimo į tikrąją dozę faktorius, jei naudojamas,
- išsami informacija apie maisto ir vandens kokybę.

### 2.2.4. **Rezultatai:**

- kūno masė ir kūno masės pokyčiai,
- maisto ir vandens suvartojimas, jei aktualu,
- toksinio atsako duomenys pagal lytį ir dozę, įskaitant toksiškumo požymius,
- atliekant klinikinius stebėjimus pastebėto poveikio pobūdis, sunkumas ir trukmė (grįžtamojo pobūdžio ar ne),
- oftalmologinio tyrimo rezultatai,
- hematologiniai bandymai su atitinkamomis pamatinėmis vertėmis,
- klinikiniai biocheminiai bandymai su atitinkamomis pamatinėmis vertėmis,
- kūno masė numarinant, organų masė ir organo/kūno masės santykis,

- nekroskopijos duomenys,
- išsamus visų histopatologinio tyrimo rezultatų aprašymas,
- statistinis rezultatų apdorojimas, jei daromas.

Rezultatų aptarimas.

Išvados.



B.28. **POŪMIS TOKSIŠKUMAS PER ODA, 90 DIENŲ KARTOTINIŲ DOZIŲ  
TOKSIŠKUMO GRAUŽIKAMS BANDYMAS**

1. **METODAS**

1.1. ĮVADAS

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

1.2. APIBRĖŽTYS

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Nėra.

1.4. BANDYMO METODO PRINCIPAS

Bandomoji medžiaga uždedama nustatytais dozėmis ant keleto eksperimentinių grupių gyvūnų odos paviršiaus, vieną dozę duodant vienos grupės gyvūnams 90 dienų. Uždedant medžiagą, gyvūnai stebimi kiekvieną dieną tam, kad būtų nustatomi toksiškumo požymiai. Darant bandymą nugaišę ar numarinti gyvūnai skrodžiami, o baigus bandymą išlikę gyvūnai taip pat numarinami ir skrodžiami.

1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

Nėra.

1.6. BANDYMO METODO APIBŪDINIMAS

1.6.1. **Pasiruošimas bandymui**

Prieš bandymą gyvūnai mažiausiai 5 dienas yra laikomi ir šeriami eksperimentinėmis sąlygomis. Prieš pradėdant bandymą sveiki jauni gyvūnai atsitiktinai atrenkami ir suskirstomi į bandomąją bei kontrolinę grupes. Prieš pat bandymą nuo bandomųjų gyvūnų nugaros nukerpamas kailis. Kailį galima ir nuskusti, tačiau tai reikėtų atlikti likus vienai parai iki bandymo pradžios. Paprastai kartotinis nukirpimas ar nuskutimas atliekamas kas savaitę. Kai kailis kerpamas arba skutamas, reikia stengtis nesubraižyti odos. Bandomajai medžiagai uždėti turėtų būti nukerpama ne mažiau kaip 10 % kūno paviršiaus. Sprendžiant, nuo kokio dydžio ploto pašalinti kailį, turėtų būti atsižvelgiama į gyvūno kūno svorį, ir į apdangalo dydį. Tiriant kietąsias medžiagas, kurios prireikus gali būti sutrinamos į miltelius, jos sudrėkinamos vandeniu arba, jei būtina, kitu tinkamu nešikliu tam, kad būtų užtikrintas geras bandomosios medžiagos ir odos sąlytis. Skystosios bandomosios medžiagos paprastai naudojamos neskiestos. Medžiagos paprastai dedamos kasdien 5–7 kartus per savaitę.

1.6.2. **Bandymo sąlygos**

1.6.2.1. *Eksperimentiniai gyvūnai*

Gali būti naudojama suaugusi žiurkė, triušis ar jūrų kiaulytė. Gali būti naudojamos kitos rūšys, bet jų naudojimas turėtų būti pagrindžiamas. Bandymo pradžioje naudojamų gyvūnų svorio intervalas turėtų būti ne daugiau kaip  $\pm 20\%$  atitinkamo vidutinio svorio. Jei prieš ilgalaikį bandymą atliekamas pusiau ūmus odos bandymas, abiejų bandymų metu reikėtų naudoti tos pačios rūšies ar veislės gyvūnus.

1.6.2.2. *Skaičius ir lytis*

Kiekvieno dydžio dozė bandoma su ne mažiau 10 gyvūnų (penkios patelės ir penki patinėliai), turinčių sveiką odą. Patelės turėtų būti neturėjusios palikuonių ir neapvaisintos. Jeigu numatoma, kad bandymo eigoje dalį gyvūnų teks numarinti, pradinis jų skaičius atitinkamai padidinamas. Be to, papildomai 20 gyvūnų grupei (po dešimt kiekvienos lyties) galima skirti didelę medžiagos dozę 90 dienų ir 28 dienas po veikimo medžiaga stebėti toksinio poveikio grįžtamumą, pastovumą ar uždelstą pasireiškimą.

### 1.6.2.3. Dozės

Turėtų būti išbandomos mažiausiai 3 bandomosios medžiagos dozės, ir turi būti kontrolinė grupė arba nešiklio kontrolinė grupė, jei naudojamas nešiklis. Gyvūnai turi būti veikiami medžiaga bent 6 valandas per dieną. Bandomoji medžiaga turėtų būti uždedama panašiu laiku kiekvieną dieną ir tam tikrais intervalais (kas savaitę arba kas dvi savaites) pakoreguojama taip, kad gyvūno kūno svorio atžvilgiu būtų išlaikoma pastovi dozė. Su kontrolinės grupės gyvūnais reikia elgtis lygiai taip pat kaip ir su bandomaisiais gyvūnais, išskyrus tai, kad jie negauna bandomosios medžiagos. Jei siekiant lengviau dozuoti medžiagą naudojamas nešiklis, kontrolinės grupės gyvūnai veikiami nešikliu taip pat kaip bandomieji gyvūnai; jie turi gauti tokį patį nešiklio kiekį, kokį gavo didžiausios dozės grupės gyvūnai. Didžiausia dozė turėtų būti tokia, kad sukeltų toksinį poveikį, bet nesukeltų gyvūnų žūties (arba tik nedidelį gaištamumą). Mažiausia dozė turėtų būti tokia, kad nebūtų pastebėta jokių toksiškumo požymių. Jeigu yra tinkamas poveikio žmogui įvertinimas, mažiausia dozė turėtų būti šiek tiek didesnė už poveikio žmogui dozę. Būtų geriausia, jeigu vidurinė dozė būtų tokia, kad sukeltų mažiausią pastebimą toksinį poveikį. Jeigu naudojama daugiau tarpinių dozių, jos turėtų būti išskirtos taip, kad toksinis poveikis būtų laipsniškas. Mažų ir tarpinių dozių bei kontrolinėje grupėje gaištamumas turėtų būti nedidelis, kad būtų galima prasmingai įvertinti rezultatus.

Jeigu bandomoji medžiaga, kuria veikiama, ypač suerzina odą, tai reikėtų sumažinti jos koncentracijas ir šitai galbūt susilpnintų medžiagos, duodamos didele doze, sukeltus toksinius poveikius arba šie visai išnyktų. Jei oda buvo ypač pažeista, tai reikia tučtuojau nutraukti bandymą ir pradėti naują, naudojant mažesnes bandomosios medžiagos koncentracijas.

### 1.6.3. Ribinis bandymas

Jeigu preliminarus bandymas naudojant 1 000 mg/kg dozę arba didesnę dozę, susijusią su tikėtinu žmogaus sąlyčiu su bandomąja medžiaga, jeigu toks žinomas, nesukelia aiškaus toksinio poveikio, tolimesnis bandymas nėra būtinas.

### 1.6.4. Stebėjimų laikotarpis

Bandomieji gyvūnai turėtų būti stebimi kiekvieną dieną, registruojant toksiškumo požymius. Reikia nurodyti nuagaišimo bei toksiškumo požymių pasireiškimo ir išnykimo laiką.

### 1.6.5. Bandymo eiga

Gyvūnai turėtų būti laikomi atskiruose narveliuose. Gyvūnai veikiami bandomąja medžiaga 90 dienų, geriausia – septynis kartus per savaitę.

Gyvūnai, esantys bet kurioje pagalbinėje grupėje ir skirti velesniams stebėjimams, turėtų būti laikomi dar 28 dienas, neveikiant jų medžiaga, kad būtų galima nustatyti, ar gyvūnai atsigauna po toksinio poveikio, ar jis išlieka. Veikimas medžiaga turėtų trukti šešias valandas per dieną.

Bandomoji medžiaga turėtų būti tvarkingai uždedama ant odos paviršiaus plotelio, sudarančio apie 10 % viso kūno paviršiaus ploto. Jei bandomos ypač toksiškos medžiagos, odos plotas, ant kurio dedama medžiaga, gali būti mažesnis, tačiau kuo daugiau jo reikia padengti kuo plonesniu ir vienesniu medžiagos sluoksniu.

Veikimo metu bandomoji medžiaga turėtų liestis su oda akytu marlės tvarščiu ir nedirginančia lipnia juostele. Bandomoji vieta turėtų būti papildomai tinkamai uždengta, kad marlės tvarstis ir bandomoji medžiaga laikytųsi bei būtų užtikrinama, kad gyvūnai nepraris bandomosios medžiagos. Gali būti naudojami ribotuvai, kad bandomoji medžiaga nebūtų praryjama, bet visiško imobilizavimo metodas nerekomenduojamas.

Veikimo pabaigoje nuo odos, ją plaunant vandeniu ar koku kitu atitinkamu valymo būdu, turėtų būt pašalintas bandomosios medžiagos likutis.

Visi gyvūnai turėtų būti stebimi kiekvieną dieną ir registruojami toksiškumo požymiai, įskaitant jų pasireiškimo pradžią, laipsnį bei trukmę. Stebint narveliuose laikomus gyvūnus, reikia registruoti odos ir kailio, akių ir gleivinės pasikeitimus, taip pat kvėpavimo, kraujo, autonominės ir centrinės nervų sistemų ir somatomotorinio aktyvumo ir elgsenos pasikeitimus. Kiekvieną savaitę reikėtų įvertinti pašaro suvartojimą bei pasverti gyvūnus. Reguliarus gyvūnų stebėjimas svarbus siekiant užtikrinti, jog bandymo metu nebūtų prarandama gyvūnų dėl tokių priežasčių kaip kanibalizmas, audinių autolizė ar narvo pastatymas netinkamoje vietoje. Pasibaigus bandymui visi likę gyvi bandomųjų grupių gyvūnai, nepriskirti pagalbinei grupei, numarinami ir skrodžiami. Kai pastebimi gaištantys gyvūnai, jie pašalinami iš bandymo ir skrodžiami.

Paprastai visi gyvūnai, įskaitant ir kontrolinės grupės gyvūnus, yra tiriami šitaip:

- prieš pradėdant duoti bandomąją medžiagą ir bandymo pabaigoje turi būti daromas, pageidautina visų, bet jei neįmanoma, tai bent didžiausios dozės ir kontrolinės grupių gyvūnų oftalmologinis tyrimas naudojant oftalmoskopą ar lygiavertę tinkamą įrangą. Jei nustatomi akių pakitimai, turi būti ištirti visi gyvūnai.

- b) bandymo pabaigoje, reikėtų įvertinti tokius hematologinius rodiklius kaip hematokritas, hemoglobino koncentracija, eritrocitų skaičius, absoliutus bei skirtingų populiacijų leukocitų skaičius ir įvertinti krešėjimo potencialą, remiantis tokiais kriterijais, kaip krešėjimo trukmė, protrombino ir tromboplastino susidarymo trukmė arba kraujo plokštelių (trombocitų) skaičius.
- c) bandymo pabaigoje reikėtų atlikti klinikinius biocheminius tyrimus. Atliekant šiuos tyrimus, reikėtų, jei reikalinga, nustatyti elektrolitų balansą, angliavandenių metabolizmą bei įvertinti kepenų ir inkstų veiklą. Parenkant specifinius tyrimus, reikėtų atsižvelgti į pastebėtus bandomosios medžiagos veikimo būdus. Siūloma nustatyti kalcį, fosforą, chlorą, natrij, kalį, badavimo metu susidarančią gliukozę (atsižvelgiant į konkrečiai gyvūnų rūšiai/veislei tinkamą badavimo laikotarpį), serumo glutamato piruvato transaminazę <sup>(1)</sup>, serumo glutamato oksalacetato transaminazę <sup>(2)</sup>, ornitino dekarboksilazę, gama glutamilo transpeptidazę, šlapale esantį azotą, albuminą, bendrą bilirubino, esančio kraujo kreatinino, kiekį bei atlikti serumo baltymų bendro kiekio nustatymą. Siekiant tinkamai įvertinti toksinį poveikį, gali reikėti atlikti lipidų, hormonų rūgščių/šarmų balanso, methemoglobino ir cholinesterazės aktyvumo tyrimus. Papildomi biocheminiai tyrimai gali būti atliekami tuo atveju, kai būtina išsamiau išnagrinėti nustatytus reiškinius.
- d) šlapimo analizės paprastai atlikti nereikia, nebent ją reikia atlikti atsižvelgiant į numatomą ar pastebėtą toksinį poveikį.

Jeigu nėra tinkamų pamatinių anksčiau atliktų bandymų duomenų, prieš pradedant medžiagos dozavimą reikėtų apsvarstyti hematologinius ir klinikinius biocheminius parametrus.

#### 1.6.6. Bendroji nekroskopija

Turėtų būti atlikta visapusiška bendra visų gyvūnų nekroskopija, kurios metu tiriamas kūno išorinis paviršius, visos angos, kiaušo, krūtinės ir pilvo ertmės bei jų turinys. Po nekroskopijos kuo skubiau (kad neišdžiūtų) pasveriamos dar drėgnos kepenys, inkstai, antinksčiai ir sėklidės. Galimiems vėlesniems histopatologiniams tyrimams turėtų būti tinkamoje terpėje išsaugomi tokie audiniai ir organai: visi esminiai pažeidimai, smegenys – įskaitant pailgųjų smegenų/smegenų tilto pjūvius, smegenėlių ir smegenų žievę, hipofizė, tiroidinė/paratiroidinė liauka, bet koks užkrūčio liaukos audinys, (trachėja), plaučiai, širdis, aorta, seilių liaukos, kepenys, blužnis, inkstai, antinksčiai, kasa, lytinės liaukos, gimda (pagalbiniai lytiniai organai), tulžies pūslė (jei yra), stemplė, skrandis, dvylikapirštė žarna, tuščioji žarna, klubinė žarna, akloji žarna, tiesioji žarna, riestoji žarna, šlapimo pūslė, pagrindinis (didysis) limfmazgis, (patelių pieno liauka), (šlaunies raumenynas), periferinis nervas, (akys), (krūtinkaulis su kaulų čiulpais), (šlaunikaulis, įskaitant ir segmentinį paviršių), (stuburo smegenys trimis lygiais – sprando, krūtinės ląstos ir juosmens) ir (ašarų liaukos). Audinius, paminėtus skliausteliuose, reikia tirti tik jei to reikia atsižvelgiant į nustatytą toksinį poveikį arba nustatytą toksinį poveikį konkrečiam organui.

#### 1.6.7. Histopatologinis tyrimas

- a) reikėtų visapusiškai histopatologiškai ištirti kontrolinės grupės ir tos grupės, kuriai duodama didelė medžiagos dozė, gyvūnų odą ir organus,
- b) reikėtų ištirti visus pagrindinius pažeidimus,
- c) reikėtų ištirti tuos kitas dozes gavusių gyvūnų organus, kurie paveikti medžiagos,
- d) jei naudojamos žiurkės, reikėtų histopatologiniu aspektu ištirti gyvūnų, kurie veikiami mažomis ir tarpinėmis medžiagos dozėmis, plaučius siekiant įsitikinti, jog jie nėra užkręsti, nes šituo remiantis nesunkiai galima įvertinti gyvūnų sveikatos būklę. Kitų histopatologinių tyrimų šių grupių gyvūnams atlikti nereikia, tačiau jei didelę dozę gavusių gyvūnų tam tikri organai yra paveikti, tuos pačius organus reikia ištirti ir šiose grupėse.
- e) kai naudojama pagalbinė grupė, reikia atlikti audinių ir organų, kuriuose, tiriant kitas gyvūnų grupes, paveiktas bandomąja medžiaga, buvo pastebėti medžiagos sukelti poveikiai, histopatologinę analizę.

## 2. DUOMENYS

Duomenys turėtų būti pateikiami apibendrintai, pasitelkiant lenteles, kuriose nurodomas kiekvienos bandomosios grupės gyvūnų skaičius bandymo pradžioje, gyvūnų, kuriuose buvo pastebėti pažeidimai, skaičius, pažeidimų tipai bei gyvūnų, kuriuose pasireiškė kiekvieno tipo pažeidimai, skaičius, išreikštas procentais. Rezultatus reikėtų vertinti atitinkamu statistiniu metodu. Galima naudoti bet kokią visuotinai pripažintą statistinį metodą.

<sup>(1)</sup> Dabar žinoma kaip serumo alanino aminotransferazė.

<sup>(2)</sup> Dabar žinoma kaip serumo aspartato aminotransferazė.

### 3. ATASKAITA

#### 3.1. BANDYMO ATASKAITA

Jei įmanoma, bandymo ataskaitoje turėtų būti pateikiama tokia informacija:

- rūšis, veislė, šaltinis, aplinkos sąlygos, pašaras,
- bandymo sąlygos,
- dozės dydžiai (įskaitant nešiklį, jei šis buvo naudojamas) ir koncentracijos,
- duomenys apie toksinį atsaką pagal tirtą lytį ir duotą dozę,
- jei įmanoma, dozės dydis, kuriam esant nepastebėta jokie neigiamos poveikio,
- nugaišimo laikas bandymo metu arba informacija, kad gyvūnai išgyveno iki bandymo pabaigos,
- toksinio ir kitokio poveikio apibūdinimas (ypač atkreipiant dėmesį į klinikinių tyrimų duomenis),
- kiekvienos anomalijos pastebėjimo laikas ir tolesnė eiga,
- duomenys apie pašarą bei kūno masę,
- oftalmologinių stebėjimų rezultatai,
- naudoti hematologiniai tyrimai ir jų metu gauti rezultatai,
- naudoti klinikinės biochemijos tyrimai ir jų metu gauti visi (įskaitant bet kurios šlapimo analizės) duomenys,
- nekroskopijos metu gauti duomenys,
- visų histopatologinių tyrimų metu gautų duomenų išsamus apibūdinimas,
- rezultatų statistinė analizė, jei įmanoma,
- rezultatų aptarimas,
- rezultatų aiškinimas.

#### 3.2. ĮVERTINIMAS IR AIŠKINIMAS

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

### 4. NUORODOS

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

B.29. **POŪMIS TOKSIŠKUMAS PER KVĖPAVIMO TAKUS. 90 DIENŲ KARTOTINIŲ DOZIŲ TOKSIŠKUMO GRAUŽIKAMS BANDYMAS**

1. **METODAS**

1.1. ĮVADAS

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

1.2. APIBRĖŽTYS

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Nėra.

1.4. BANDYMO METODO PRINCIPAS

Keletas eksperimentinių gyvūnų grupių 90 dienų laikotarpiu kiekvieną dieną tam tikrą laiką veikiami skirtingo dydžio koncentracijos bandomąja medžiaga: vienos grupės gyvūnai veikiami to paties dydžio koncentracija. Kai norint pasiekti atitinkamą bandomosios medžiagos koncentraciją atmosferoje naudojamas nešiklis, turėtų būti naudojama kontrolinė nešikliu veikiamą grupę. Veikimo metu gyvūnai stebimi kiekvieną dieną siekiant nustatyti toksiškumo požymius. Darant bandymą nugaišę ar numarinti gyvūnai skrodžiami, o baigus bandymą išlikę gyvūnai taip pat numarunami ir skrodžiami.

1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

Nėra.

1.6. BANDYMO METODO APIBŪDINIMAS

1.6.1. **Pasirengimas**

Prieš bandymą gyvūnai mažiausiai 5 dienas yra laikomi ir šeriami eksperimentinėmis sąlygomis. Prieš pradėdant bandymą sveiki jauni gyvūnai atsitiktinai paskirstomi į bandomąją bei kontrolinę grupes. Jei reikia, į bandomąją medžiagą galima įdėti tinkamo nešiklio, kad atmosferoje būtų tinkama jos koncentracija. Jei dozavimui palengvinti naudojamas nešiklis ar kiti priedai, jie turėtų būti netoksiški. Prireikus galima naudotis anksčiau atliktų bandymų duomenimis.

1.6.2. **Bandymo sąlygos**

*Eksperimentiniai gyvūnai*

Tinkamiausia naudoti gyvūnų rūšis – žiurkės, nebent yra kontraindikacijų. Reikėtų naudoti įprastinių laboratorinių veislių jaunos sveikus gyvūnus. Bandymo pradžioje naudojamų gyvūnų svorio intervalas turėtų būti ne daugiau kaip  $\pm 20\%$  atitinkamo vidutinio svorio. Jei poūmio toksiškumo bandymas atliekamas kaip preliminarus bandymas prieš ilgalaikį bandymą, abiejų bandymų metu naudojamos tos pačios rūšys ir veislės.

*Skaičius ir lytis*

Kiekviena medžiagos koncentracija išbandoma su mažiausiai 20 gyvūnų (10 patelių ir 10 patinėlių). Patelės turėtų būti dar neturėjusios palikuonių ir neapvaisintos. Jeigu numatoma, kad bandymo eigoje dalį gyvūnų teks numarinti, pradinis jų skaičius atitinkamai padidinamas. Be to, papildomai 20 gyvūnų grupei (po dešimt kiekvienos lyties) galima skirti didelę medžiagos dozę 90 dienų ir 28 dienas po veikimo medžiaga stebėti toksinio poveikio grįžtamumą, pastovumą ar uždelstą pasireiškimą.

### *Medžiagos, kuria veikiama, koncentracijos*

Turėtų būti išbandomos mažiausiai 3 bandomosios medžiagos dozės, ir turi būti kontrolinė grupė arba nešiklio kontrolinė grupė (kuriai skiriamas didžiausias bandomiesiems gyvūnams naudojamas nešiklio kiekis), jei naudojamas nešiklis. Su kontrolinės grupės gyvūnais reikia elgtis lygiai taip pat kaip ir su bandomaisiais gyvūnais, išskyrus tai, kad jie negauna bandomosios medžiagos. Didžiausia dozė turėtų būti tokia, kad sukeltų toksinį poveikį, bet nesukeltų gyvūnų žūties (arba tik nedidelį gaištamumą). Jeigu yra tinkamas poveikio žmogui įvertinimas, mažiausia dozė turėtų būti šiek tiek didesnė už poveikio žmogui dozę. Geriausia būtų, kad vidutinė koncentracija sukeltų mažiausius pastebimus toksiškumo požymius. Jeigu naudojama daugiau nei viena vidutinė koncentracija, koncentracijos turi būti paskirstomos taip, kad toksiškumo požymiai pasireikštų laipsniškai. Kontrolinės grupės ir grupių, kurios veikiamos mažomis bei vidutinėmis koncentracijomis, gyvūnų gaištamumas turėtų būti toks, kad būtų galima prasmingai įvertinti rezultatus.

### *Veikimo trukmė*

Gyvūnai kasdien veikiami medžiaga šešias valandas po to, kai bandymo kameroje nusistovi vienoda medžiagos koncentracija.

### *Įranga*

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 veikiamoji atmosfera. Jeigu naudojama kamera, ji turėtų būti tokios konstrukcijos, kad gyvūnai kuo mažiau susigrūstų ir kad jie įkvėptų kuo daugiau bandomosios medžiagos. Paprastai, norint užtikrinti kameros atmosferos pastovumą, visas bandomų gyvūnų „tūris“ neturėtų viršyti 5 % bandymo kameros tūrio. Atskirose kameroje gali būti paveikiama burna ir nosis, tik galva arba visas kūnas; du pirmieji būdai padeda sumažinti bandomosios medžiagos patekimą kitais keliais.

### *Stebėjimų laikotarpis*

Visi gyvūnai veikimo laikotarpiu ir sveikimo laikotarpiu stebimi kasdien siekiant nustatyti toksiškumo požymius. Reikėtų užregistruoti nugaišimo laiką ir laiką, kai pasireiškia bei išnyksta toksiškumo požymiai.

#### 1.6.3. **Bandymo eiga**

Gyvūnai 90 dienų laikotarpiu nuo penkių iki septynių dienų per savaitę kiekvieną dieną veikiami bandomąja medžiaga. Bet kurios papildomos grupės, skirtos tolesniam stebėjimui, gyvūnai turėtų būti laikomi dar 28 dienas neveikiami medžiaga, kad būtų galima nustatyti, ar jie atsigauja po toksinio poveikio, ar poveikis išlieka. Bandymo metu turėtų būti palaikoma  $22 \pm 3$  °C temperatūra. Optimali santykinė drėgmė turėtų būti 30–70 %, tačiau kai kuriais atvejais (pvz., tiriant aerosolius) tai nebūtina. Veikimo metu pašaras ir girdymas turėtų išlikti nepakitę.

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 veikimo kameroje būtų užtikrinamos vienodos sąlygos. Tokia sistema turėtų būti užtikrinta, kad kaip galima greičiau būtų sukuriamos nekintamos veikimo sąlygos.

Turėtų būti matuojama arba stebima:

- a) oro srauto intensyvumas (nuolat);
- b) faktinė bandomosios medžiagos, esančios kvėpuojamojoje zonoje, koncentracija. Kasdieninio veikimo metu bandomosios medžiagos koncentracija neturėtų keistis  $\pm 15$  % vidutinės vertės. Tačiau dulkių ir aerosolių atveju toks kontrolės lygis gali būti neįmanomas, todėl priimtinos platesnės ribos. Visą bandymo laikotarpį kasdienės koncentracijos turėtų būti palaikomos kuo vienodesnės. Kuriant palaikančiąją sistemą, reikėtų atlikti dalelių dydžio analizę tam, kad būtų užtikrintas aerosolių koncentracijų pastovumas. Veikimo metu reikėtų kaip galima dažniau atlikti analizę tam, kad būtų nustatomas dalelių pasiskirstymo pastovumas;
- c) temperatūra ir drėgmė;
- d) veikimo laikotarpiu ir jam pasibaigus gyvūnai stebimi ir šie stebėjimai ir sistemingai užrašomi, apie kiekvieną gyvūną darant atskirus įrašus. Visus gyvūnus reikėtų stebėti kasdien ir registruoti toksiškumo požymius, įskaitant požymių pasireiškimo laiką, laipsnį bei trukmę. Narveliuose esančių gyvūnų stebėjimai apima: odos bei kailio, 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 bei pasverti gyvūnus. Reguliariai stebėti gyvūnus reikia todėl, kad jie nebūtų prarandami bandymo

metu dėl tokių priežasčių kaip kanibalizmas, audinių autolizė ar netinkama laikymo vieta. Pasibaigus veikimo laikotarpiui visi išlikę gyvūnai numarinami ir atliekama jų nekroskopija. Gaištantys gyvūnai turėtų būti pašalinami iš bandymo, kai tik tai pastebima, ir turėtų būti atliekama jų nekroskopija.

Paprastai visi gyvūnai, įskaitant ir kontrolinius individus, tiriami taip:

- a) prieš pradėdant duoti bandomąją medžiagą ir bandymo pabaigoje turi būti daromas, pageidautina visų, bet jei neįmanoma, tai bent didžiausios dozės ir kontrolinės grupių gyvūnų oftalmologinis tyrimas naudojant oftalmoskopą ar lygiavertę tinkamą įrangą. Jei nustatomi akių pakitimai, turi būti ištirti visi gyvūnai;
- b) bandymo pabaigoje, reikėtų įvertinti tokius hematologinius rodiklius kaip hematokritas, hemoglobino koncentracija, eritrocitų skaičius, absoliutus bei skirtingų populiacijų leukocitų skaičius ir įvertinti krešėjimo potencialą, remiantis tokiais kriterijais, kaip krešėjimo trukmė, protrombino ir tromboplastino susidarymo trukmė arba kraujo plokštelių (trombocitų) skaičius;
- c) bandymo pabaigoje reikėtų atlikti klinikinius biocheminius tyrimus. Atliekant šiuos tyrimus, reikėtų, jei reikalinga, nustatyti elektrolitų balansą, angliavandenių metabolizmą bei įvertinti kepenų ir inkstų veiklą. Parenkant specifinius tyrimus, reikėtų atsižvelgti į pastebėtus bandomosios medžiagos veikimo būdus. Siūloma nustatyti kalcį, fosforą, chlorą, natrij, kalį, badavimo metu susidarančią gliukozę (atsižvelgiant į konkrečiai gyvūnų rūšiai/veislei tinkamą badavimo laikotarpį), serumo glutamato piruvato transaminazę <sup>(1)</sup>, serumo glutamato oksalacetato transaminazę <sup>(2)</sup>, ornitino dekarboksilazę, gama glutamilo transpeptidazę, šlapale esantį azotą, albuminą, bendrą bilirubino, esančio kraujo kreatinino, kiekį bei atlikti serumo baltymų bendro kiekio nustatymą. Siekiant tinkamai įvertinti toksinį poveikį, gali reikėti atlikti lipidų, hormonų rūgščių/šarmų balanso, metemoglobino ir cholinesterazės aktyvumo tyrimus. Papildomi biocheminiai tyrimai gali būti atliekami tuo atveju, kai būtina išsamiau išnagrinėti nustatytus reiškinius.
- d) šlapimo analizės paprastai atlikti nereikia, nebent ją reikia atlikti atsižvelgiant į numatomą ar pastebėtą toksinį poveikį.

Jeigu nėra tinkamų pamatinių anksčiau atliktų bandymų duomenų, prieš pradėdant medžiagos dozavimą reikėtų apvarstyti hematologinius ir klinikinius biocheminius parametrus.

#### *Bendroji nekroskopija*

Turėtų būti atlikta visapusiška bendra visų gyvūnų nekroskopija, kurios metu tiriamas kūno išorinis paviršius, visos angos, kiaušo, krūtinės ir pilvo ertmės bei jų turinys. Po nekroskopijos kuo skubiau (kad neišdžiūtų) pasveriamos dar drėgnos kepenys, inkstai, antinksčiai ir sėklidės. Galimiems vėlesniems histopatologiniams tyrimams turėtų būti tinkamoje terpėje išsaugomi tokie audiniai ir organai: visi esminiai pažeidimai, plaučiai, kurie turėtų būti išimti nepažeisti, pasverti ir apdoroti tinkamu fiksyvu tam, kad būtų išlaikyta plaučių struktūra (efektyvi procedūra – perfuzija fiksyvu), nazofaringinis audinys, smegenys – įskaitant pailgųjų smegenų/smegenų tilto pjūvius, smegenėlių ir smegenų žievę, hipofizė, tiroidinė/paratiroidinė liauka, 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), stemplė, skrandis, dvylikapirštė žarna, tuščioji žarna, klubinė žarna, akloji žarna, tiesioji žarna, riestoji žarna, šlapimo pūslė, pagrindinis (didysis) limfmazgis, (patelių pieno liauka), (šlaunies raumenynas), periferinis nervas, 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 jei to reikia atsižvelgiant į nustatytą toksinį poveikį arba nustatytą toksinį poveikį konkrečiam organui.

#### *Histopatologinis tyrimas:*

- a) reikėtų visapusiškai histopatologiškai ištirti kontrolinės grupės ir tos grupės, kuriai duodama didelė medžiagos dozė, gyvūnų kvėpavimo traktą ir kitus organus bei audinius;
- b) reikėtų ištirti visus pagrindinius pažeidimus;
- c) reikėtų ištirti tuos kitas dozes gavusių gyvūnų organus, kurie paveikti medžiagos;
- 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

<sup>(1)</sup> Dabar žinoma kaip serumo alanino aminotransferazė.

<sup>(2)</sup> Dabar žinoma kaip serumo aspartato aminotransferazė.

nepivaloma, tačiau jei nustatomi didelių dozių grupės gyvūnų organų pažeidimai, tie patys organai ištiriami ir mažos bei vidutinės dozės grupėse;

- e) kai naudojama pagalbinė grupė, tai reikia atlikti audinių ir organų, kuriuose, tiriant kitas gyvūnų grupes, paveiktas bandomąja medžiaga, buvo pastebėtas medžiagos sukeltas poveikis, histopatologinę analizę.

## 2. DUOMENYS

Duomenys turėtų būti pateikiami apibendrintai, pasitelkiant lenteles, kuriose nurodomas kiekvienos bandomosios grupės gyvūnų skaičius bandymo pradžioje, gyvūnų, kuriuose buvo pastebėti pažeidimai, skaičius, pažeidimų tipai bei gyvūnų, kuriuose pasireiškė kiekvieno tipo pažeidimai, skaičius, išreikštas procentais. Rezultatus reikėtų vertinti atitinkamu statistiniu metodu. Galima naudoti bet koki visuotinai pripažintą statistinį metodą.

## 3. ATASKAITA

### 3.1. BANDYMO ATASKAITA

Jei įmanoma, bandymo ataskaitoje turėtų būti pateikiama tokia informacija:

- rūšis, veislė, šaltinis, aplinkos sąlygos, pašaras,
- bandymo sąlygos:

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 temperatūros, drėgmės ir, jei reikia, aerozolių koncentracijų arba dalelių dydžio stabilumo matavimo prietaisus.

Veikimo duomenys: duomenys turėtų būti pateikiami lentelėse, nurodant vidurkius ir kintamumą (pvz., standartinį nukrypimą); nurodoma:

- a) oro srauto, pereinančio per inhaliacinę įrangą, greitis;
  - b) oro temperatūra ir drėgmė;
  - c) nominalios koncentracijos (absoliutus inhaliacinėje įrangoje esantis bandomosios medžiagos kiekis, padalytas iš oro tūrio);
  - d) nešiklio, jei jis naudojamas, pobūdį;
  - e) faktinės koncentracijos, esančias bandomoje kvėpuojamoje zonoje;
  - f) vidutinius dalelių dydžius (jei aktualu):
- duomenys apie toksinį atsaką pagal tirtą lytį ir medžiagos koncentraciją,
  - jei įmanoma, dozės dydis, kuriam esant nepastebėta jokio neigiamo poveikio,
  - nugaišimo laikas bandymo metu arba informacija, kad gyvūnai išgyveno iki bandymo pabaigos,
  - toksinio ir kitokio poveikio apibūdinimas,
  - kiekvienos anomalijos pastebėjimo laikas ir tolesnė eiga,
  - duomenys apie pašarą bei kūno masę,
  - oftalmologinių stebėjimų rezultatai,



- naudoti hematologiniai tyrimai ir jų metu gauti rezultatai,
- naudoti klinikinės biochemijos tyrimai ir jų metu gauti visi (įskaitant šlapimo analizės) duomenys,
- nekroskopijos metu gauti duomenys,
- visų histopatologinių tyrimų metu gautų duomenų išsamus apibūdinimas,
- rezultatų statistinė analizė (jei įmanoma),
- rezultatų aptarimas,
- rezultatų aiškinimas.

### 3.2. ĮVERTINIMAS IR AIŠKINIMAS

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

### 4. NUORODOS

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

## B.30. LĖTINIO TOKSIŠKUMO BANDYMAS

## 1. METODAS

## 1.1. ĮVADAS

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

## 1.2. APIBRĖŽTYS

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

## 1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Nėra.

## 1.4. BANDYMO METODO PRINCIPAS

Bandomoji medžiaga paprastai duodama septynis kartus per savaitę atitinkamu būdu keletui eksperimentinių gyvūnų grupių, vieną dozę duodant vienai grupei didžiąją gyvūnų gyvenimo dalį. Veikimo bandomąja medžiaga laikotarpiu ir jam pasibaigus eksperimentiniai gyvūnai stebimi kasdien, siekiant nustatyti toksiškumo požymius.

## 1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

Nėra.

## 1.6. BANDYMO METODO APIBŪDINIMAS

**Pasiruošimas bandymui**

Prieš bandymą mažiausiai 5 dienas gyvūnai yra laikomi ir šeriami eksperimentinėmis sąlygomis. Prieš pradėdant bandymą sveiki jauni gyvūnai atsitiktinai atrenkami ir suskirstomi į bandomąją bei kontrolinę grupes.

**Bandymo sąlygos**

Ekspimentiniai gyvūnai

Tinkamiausia rūšis yra žiurkės.

Remiantis anksčiau atliktų bandymų duomenimis, gali būti naudojamos ir kitos (graužikų arba negrauzikų) rūšys. Reikėtų naudoti įprastinių laboratorinių veislių sveikus jaunos gyvūnus, o medžiagos davimas turėtų prasidėti iškart po atjunkymo.

Bandymo pradžioje gyvūnų svorio pokyčiai neturėtų viršyti  $\pm 20\%$  atitinkamo vidutinio svorio. Jei prieš ilgalaikį bandymą yra atliekamas pusiau ūmaus poveikio per virškinamąjį traktą bandymas, abiejų bandymų metu reikėtų naudoti tos pačios rūšies ir veislės gyvūnus.

Skaičius ir lytis

Grauzikų atveju kiekviena dozė išbandoma su mažiausiai 40 gyvūnų (20 patelių ir 20 patinėlių). Patelės turi būti dar neturėjusios palikuonių ir neapvaisintos. Jeigu numatoma, kad bandymo eigoje dalį gyvūnų teks numarinti, pradinis jų skaičius atitinkamai padidinamas.

Negrauzikų atveju priimtina, kad būtų naudojamas mažesnis gyvūnų skaičius, tačiau kiekvienoje grupėje turi būti mažiausiai po 4 kiekvienos lyties gyvūnus.

## Dozės ir veikimo dažnumas

Turėtų būti naudojamos mažiausiai 3 skirtingų dozių grupės ir kontrolinė grupė. Didžiausia dozė turėtų būti tokia, kuri sukelia aiškiai pasireiškiantį toksinį poveikį, tačiau ne pernelyg didelį gaištamumą. Mažiausia dozė neturėtų sukelti akivaizdaus toksinio poveikio.

Tarpinė(s) dozė(s) turėtų būti išdėstyta (-os) tarp didžiausios ir mažiausios dozių.

Pasirenkant dozes reikėtų remtis anksčiau atliktų toksiškumo bandymų ir testų duomenimis.

Veikiama turėtų būti kasdien.

Jei cheminė medžiaga duodama sumaišius ją su vandeniu ar pašaru, jie turėtų būti nuolat prieinami.

## Kontrolė

Kartu reikėtų naudoti kontrolinę grupę, kuri visais aspektais identiška bandomosioms grupėms, išskyrus veikimą bandomąja medžiaga.

Ypatingais atvejais, tokiais kaip poveikio per kvėpavimo takus bandymai naudojant aerozolius arba bandymai per virškinamąjį traktą naudojant nežinomo biologinio aktyvumo emulsiklius, reikėtų taipogi naudoti ir neigiamą kontrolinę grupę. Neigiamą kontrolinę grupę veikiama taip pat kaip ir bandomosios grupės, išskyrus tai, kad gyvūnai neveikiami jokia bandomąja medžiaga nei nešikliu.

## Davimo būdas

Yra du pagrindiniai medžiagos davimo būdai – per virškinimo traktą ir per kvėpavimo takus. Davimo būdo pasirinkimas priklauso nuo bandomosios medžiagos fizikinių ir cheminių savybių ir nuo to, kuris žmonių sąlyčio su medžiaga būdas labiau tikėtinas.

Veikiant per odą susiduriama su didelėmis praktinio pobūdžio problemomis. Lėtinis sisteminis toksiškumas, atsirandantis dėl poodinės absorbcijos, įprastiniu atveju gali būti įtakojamas kito bandymo per virškinamąjį traktą metu gautamų duomenų ir informacijos apie poodinę absorbciją, įvertintą anksčiau atlikus poodinio toksiškumo bandymus.

## Bandymas per virškinamąjį traktą

Jei bandomoji medžiaga absorbuojama per virškinamąjį traktą ir jei tai yra galimas žmonių sąlyčio su medžiaga būdas, pasirenkamas medžiagos davimo per virškinamąjį traktą būdas, nebent yra kontraindikacijų. Gyvūnai gali gauti bandomąją medžiagą su maistu, ištirpintą vandenyje arba su kapsule. Geriausia, kad dozavimas būtų atliekamas septynis kartus per savaitę kasdien, nes dozuojant 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, visų pirma atsižvelgiant į praktinius sumetimus, veikimas medžiaga penkis kartus per savaitę laikomas priimtiniu.

## Poveikio per kvėpavimo takus bandymas

Kadangi atliekant poveikio per kvėpavimo takus bandymus iškyla sudėtingesnių techninių problemų nei duodant bandomąją medžiagą kitais būdais, čia pateikiamos išsamios gairės, kaip duoti medžiagą šiuo būdu. Reikėtų pažymėti, kad ypatingų situacijų atveju lašinimas į trachėją gali būti alternatyvus problemos sprendimo būdas.

Ilgalaikis veikimas medžiaga dažniausiai modeliuojamas atsižvelgiant į žmonių sąlytį su medžiaga. Gyvūnai veikiami arba kasdien šešias valandas po to, kai suvienodinamos koncentracijos kameros viduje, penkis kartus per savaitę (protarpinis veikimas) arba, atsižvelgiant į galimą veikimą per aplinką, veikiama 22–24 valandas per dieną septynis kartus per savaitę (nuolatinis veikimas) ir veikimas pertraukiamas tik vienai valandai, kol gyvūnai pašeriami ir sutvarkoma kamera.

Abiem atvejais gyvūnai veikiami nustatyto dydžio bandomosios medžiagos koncentracijomis. Pagrindinis protarpinio ir nuolatinio veikimo būdų skirtumas yra tas, kad veikiant protarpiais kasdien susidaro 17–18 valandų intervalai, per kuriuos gyvūnai gali atsigausti po kasdienio veikimo poveikio, o savaitgalį šis intervalas dar ilgesnis.

Kuris veikimo būdas - protarpinis ar nuolatinis - bus pasirinktas, priklauso nuo bandymo tikslų bei nuo imituojamo žmogaus sąlyčio su medžiaga. Tačiau reikia apsvarstyti ir konkrečius techninius sunkumus. Pavyzdžiui, nuolatinio veikimo, kuriuo imituojamos aplinkos sąlygos, teikiamus privalumus gali atsverti tai, kad veikimo metu

gyvūnus reikia šerti ir girdyti ir dėl to, kad reikia naudoti daug sudėtingesnius (bei patikimesnius) aerozolio ir garų sukūrimo ir kontrolės metodus.

#### Veikimo kamera

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 veikimo atmosfera. Kontrolinė kamera ir toji, kurioje atliekamas veikimas, turėtų būti identiškos pagal konstrukciją ir modelį tam, kad veikimo sąlygos būtų palyginamos visais aspektais, išskyrus veikimą bandomąja medžiaga. Nežymus neigiamas slėgis kameros viduje paprastai palaikomas tam, kad bandomoji medžiaga nepatektų į supančią aplinką. Bandomieji gyvūnai kameroje turėtų būti nesusingrūdę. Siekiant užtikrinti kameros oro stabilumą, tūris, kurį užima bandomieji gyvūnai, neturėtų viršyti 5 % bandymui naudojamos kameros tūrio.

Turėtų būti matuojama arba stebima:

- i) oro srautas: oro srauto, patenkančio per kamerą, greitis turi būti nuolat kontroliuojamas;
- ii) koncentracija: kasdieninio veikimo metu bandomosios medžiagos koncentracija neturėtų būti didesnė kaip  $\pm 15\%$  vidutinės vertės;
- iii) temperatūra ir drėgmė: graužikų atveju turėtų būti palaikoma  $22 \pm 2$  °C temperatūra ir drėgmė kameroje turėtų siekti nuo 30 % iki 70 %, išskyrus tą atvejį, kai naudojamas vanduo tam, kad bandomoji medžiaga virstų suspensija kameros atmosferoje. Reikėtų nuolat stebėti temperatūrą bei drėgmę;
- iv) dalelių dydžio matavimai: reikėtų nustatyti kameros atmosferoje esančių dalelių dydžio pasiskirstymą, kai naudojami skysčiai ir kietųjų dalelių aerozoliai. Aerozolių dalelės turėtų būti tokio dydžio, kad naudojamas bandomasis gyvūnas jas galėtų įkvėpti. Kameros atmosferos mėginiai turėtų būti imami gyvūnų įkvėpimo zonoje. 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 nustatinti 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.

#### Bandymo trukmė

Veikimas turėtų trukti mažiausiai 12 mėnesių.

#### Bandymo eiga

##### Stebėjimai

Išsamus klinikinis tyrimas turėtų būti atliekamas vieną kartą per dieną. Kasdien reikėtų atlikti papildomus stebėjimus ir imtis atitinkamų veiksmų siekiant sumažinti gyvūnų praradimą bandymo metu, pavyzdžiui, atlikti nekroskopiją ar užšaldyti tuos gyvūnus, kurie buvo rasti nugaišę ir izoliuoti ar numarinti silpnus bei gaištančius gyvūnus. Reikėtų kruopščiai nustatyti toksinio poveikio 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 gaištamumas. Reikėtų registruoti ir toksinių sąlygų, įskaitant ir įtariamus auglius, pasireiškimo laiką bei eigą.

Per pirmąsias tryliką bandymo savaitių kartą per savaitę reikėtų registruoti visų gyvūnų kūno masę ir po to vieną kartą per savaitę kas mėnesį. Per pirmąsias tryliką bandymo savaitių kas savaitę, o vėliau kas tris mėnesius reikėtų įvertinti pašaro suvartojimą, nebent dėl gyvūnų sveikatos būklės ar svorio reikėtų elgtis kitaip.

#### 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, šešiais mėnesiams, o paskui kas pusę metų ir bandymo pabaigoje; kraujo mėginiai imami iš visų negrauzikų, o žiurkių atveju – iš 10 kiekvienos lyties gyvūnų kiekvienoje grupėje. Jei įmanoma, kraujo mėginiai imami iš tų pačių žiurkių tokio pačiu laiko intervalu. Be to, iš negrauzikų reikėtų paimiti išankstinius mėginius tyrimui.

Jei, remiantis klinikiniais stebėjimais, spėjama, kad bandymo metu sutriko gyvūnų sveikata, turėtų būti atliekama diferencinė paveiktų gyvūnų kraujo analizė.

Atliekama diferencinė gyvūnų, kuriems buvo duota didžiausia medžiagos dozė, bei kontrolinės grupės gyvūnų kraujo mėginių analizė. Mažesnę dozę gavusių gyvūnų kraujo diferencinė analizė atliekama tokiu atveju, jei nustatytas didelis neatitikimas tarp didžiausią dozę gavusios ir kontrolinės grupės arba jei to reikia atsižvelgiant į patologinių tyrimų rezultatus.

#### Šlapimo analizė

Šlapimo mėginiai turėtų būti paimti iš visų negrauzikų ir iš 10 kiekvienos lyties kiekvienos grupės graužikų, jei įmanoma, tų pačių, kurie naudoti hematologiniam tyrimui. Visų gyvūnų mėginiai arba bendri konkrečios grupės konkrečios lyties graužikų mėginiai ištiriami taip:

- išorė: individualaus gyvūno šlapimo tūris bei tankis,
- baltymų, gliukozės, ketonų, paslėpto kraujo kiekis (pusiau kiekybiškai),
- nuosėdų mikroskopinis vaizdas (pusiau kiekybiškai).

#### Klinikiniai cheminiai tyrimai

Maždaug kas šešis mėnesius ir bandymo pabaigoje iš visų negrauzikų bei 10 kiekvienos lyties kiekvienos grupės žiurkių, jei įmanoma, iš tų pačių žiurkių tokiais pačiais laiko tarpais, 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 bandymas, glutamino piruvato transaminazės <sup>(1)</sup> aktyvumo nustatymo bandymas ir glutamato oksalacetato transaminazės <sup>(2)</sup> aktyvumo nustatymo bandymas), gama glutamiltranspeptidazė, ornitino dekarboksilazė,
- angliavandenių metabolizmas, įvertinant gliukozės kraujyje trūkumą,
- inkstų funkciniai testai, tokie kaip šlapalo nustatymas kraujyje.

#### Bendroji nekroskopija

Turėtų būti atlikta visapusiška bendra visų gyvūnų nekroskopija, įskaitant tuos kurie nugaišo bandymo metu arba buvo numarinti tada, kai buvo nustatyta, jog jie gaišta. Prieš numarinimą turėtų būti paimti visų gyvūnų kraujo mėginiai tam, kad būtų atlikta diferencinė kraujo analizė. Visi akivaizdžiai matomi pažeidimai, augliai ar pažeidimai, kurie, kaip įtariama, gali būti augliai, turėtų būti užkonservuoti. Reikėtų stengtis rasti sąsajas tarp pagrindinių stebėjimų ir mikroskopinių analizių.

Histopatologiniams tyrimams paprastai turėtų būti išsaugomi šie audiniai ir organai: smegenys <sup>(3)</sup> (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 <sup>(3)</sup>, blužnis, inkstai <sup>(3)</sup>, antinksčiai <sup>(3)</sup>, stemplė, skrandis, dvylikapirštė žarna, tuščioji ir žarna, klubinė žarna, akloji žarna, tiesioji žarna, riestoji žarna, gimda, šlapimo pūslė, limfmazgiai, kasa, lytinės liaukos <sup>(3)</sup>, pagalbinių lytinių 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 poveikio per kvėpavimo takus bandymuose yra svarbus atitinkamų histopatologinių tyrimų aspektu. Specialių bandymų, tokių kaip poveikio per kvėpavimo takus bandymas atveju, reikėtų tirti visą kvėpavimo traktą, įskaitant nosies ertmę, gerklą ir ryklę.

<sup>(1)</sup> Dabar žinoma kaip serumo alanino aminotransferazė.

<sup>(2)</sup> Dabar žinoma kaip serumo aspartato aminotransferazė.

<sup>(3)</sup> Šie organai, paimti iš 10 kiekvienos lyties ir visų grupių graužikų bei visų negrauzikų, taip pat visų negrauzikų skydliaukė (su prieskydine liauka) turėtų būti pasverti.

Jei atliekami kiti klinikiniai tyrimai, tai šių procedūrų metu gauta informacija turėtų būti pateikta prieš atliekant mikroskopinę analizę, nes ta informacija gali būti svarbi patologui.

#### Histopatologinis tyrimas

Visi akivaizdūs pokyčiai, ypač bet kurio organo augliai ir kiti pažeidimai, turėtų būti tiriami mikroskopiškai. Be to, rekomenduojama atlikti tokias procedūras:

- a) visų užkonservuotų organų ir audinių mikroskopinę analizę, visapusiškai apibūdinant pažeidimus, rastus:
  1. visuose gyvūnuose, kurie nugaišo arba buvo numarinti bandymo metu;
  2. visuose bandomosios grupės, kuriai buvo duota didelė medžiagos dozė, bei kontrolinės grupės gyvūnuose;
- b) tie organai ir audiniai, kurių anomalijas sukėlė arba galėjo sukelti bandomoji medžiaga, ištiriami mažesnės dozės grupėje;
- c) jei bandymo metu gaunama įrodymų, kad gyvūnų gyvenimo normali trukmė ypač sutrumpėjo arba atsirado poveikiai, galintys turėti įtakos toksiniam atsakui, tai vienu dydžiu mažesnę dozę gavusi gyvūnų grupė tiriama taip, kaip aprašyta pirmiau;
- d) informacija apie tos pačios veislės bandomųjų gyvūnų pažeidimų dažnį tomis pačiomis laboratorinėmis sąlygomis, t. y. anksčiau atliktų bandymų duomenys, yra būtina norint teisingai įvertinti bandomąją medžiaga paveiktų gyvūnų pokyčių, reikšmę.

## 2. DUOMENYS

Duomenys turėtų būti apibendrinti lentelėse, nurodant kiekvienos bandomosios grupės gyvūnų skaičių bandymo pradžioje, paveiktų gyvūnų skaičių ir gyvūnų, kuriems pasireiškė kiekvienos rūšies pažeidimai, procentą. Rezultatus reikėtų vertinti atitinkamu statistiniu metodu. Gali būti naudojamas bet kuris pripažintas statistikos metodas.

## 3. ATASKAITA

### 3.1. BANDYMO ATASKAITA

Jei įmanoma, bandymo ataskaitoje turėtų būti pateikiama tokia informacija:

- rūšis, veislė, šaltinis, aplinkos sąlygos, pašaras,
- bandymo 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 temperatūros, drėgmės ir, jei reikia, aerosolių koncentracijų arba dalelių dydžio stabilumo matavimo prietaisus.

Veikimo duomenys:

Duomenys turėtų būti pateikiami lentelėse, nurodant vidurkius ir variacijos dydį (pvz., standartinį nukrypimą) ir pateikiant:

- a) oro srauto, pereinančio per inhaliacinę įrangą, greitį;

- b) oro temperatūrą ir drėgmę;
  - c) nominalias koncentracijas (absoliutus inhaliacinėje įrangoje esančios bandomosios medžiagos kiekis, padalytas iš oro tūrio);
  - d) nešiklio, jei jis naudojamas, pobūdį;
  - e) faktines koncentracijas, esančias bandomoje kvėpuojamoje zonoje;
  - f) vidutinius dalelių dydžius (jei įmanoma nurodyti),
- dozių dydžiai (įskaitant nešiklį, jei naudojamas) ir koncentracijos vertės,
  - duomenys apie toksinį atsaką pagal tirtą lytį ir duotą dozę,
  - didžiausia dozė, kurią davus nepastebėta neigiamo poveikio,
  - nugaišimo laikas bandymo metu arba informacija, kad gyvūnai išgyveno iki numarinimo,
  - toksinio ir kitokio poveikio apibūdinimas,
  - kiekvienos anomalijos pastebėjimo laikas ir tolesnė eiga,
  - duomenys apie pašarą bei kūno masę,
  - oftalmologinių stebėjimų rezultatai,
  - naudoti hematologiniai tyrimai ir jų metu gauti rezultatai,
  - naudoti klinikinės biochemijos tyrimai ir jų metu gauti visi (įskaitant bet kurios šlapimo analizės) duomenys,
  - nekroskopijos metu gauti duomenys,
  - visų histopatologinių tyrimų metu gautų duomenų išsamus apibūdinimas,
  - rezultatų statistinė analizė, jei įmanoma,
  - rezultatų aptarimas,
  - rezultatų aiškinimas.

### 3.2. ĮVERTINIMAS IR AIŠKINIMAS

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

### 4. NUORODOS

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

## B.31. TOKSIŠKUMO PRENATALINIAM VYSTYMUISI BANDYMAS

## 1. METODAS

Šis metodas atitinka OECD TG 414 (2001).

## 1.1. ĮVADAS

Šis toksiškumo prenataliniam vystymuisi bandymo metodas skirtas suteikti bendros informacijos apie poveikį vaikingai patelei ir jos gimdoje augančio vaisiaus prenataliniam vystymuisi; tai gali būti poveikio motinai, iškaitant žūtį, įvertinimas, struktūrinės anomalijos arba vaisiaus augimo pakitimai. Funkciniai trūkumai, nors ir yra svarbi vystymosi dalis, nėra šio bandymo metodo sudėtinė dalis. Jie gali būti ištiriami darant atskirą bandymą arba kaip šio bandymo papildymas, naudojant neurotoksiškumo vystymuisi bandymo metodą. Jei reikia gauti daugiau informacijos apie funkcinį trūkumą ir kito postnatalinio poveikio bandymą, reikėtų atitinkamai žiūrėti toksiškumo dviejų kartų dauginimuisi bandymo metodą ir neurotoksiškumo vystymuisi bandymo metodą.

Gali tekti šį bandymo metodą specialiai pritaikyti atskiriems atvejams atsižvelgiant į konkrečias žinias, pvz., bandomosios medžiagos fizikines ir chemines arba toksikologines savybes. Toks pritaikymas priimtinas, kai įrodantys moksliniai duomenys rodo, kad dėl to bandymas bus informatyvesnis. Tokiais atvejais šie moksliniai įrodymai turi būti kruopščiai aprašyti bandymo ataskaitoje.

## 1.2. APIBRĖŽTYS

**Vystymosi toksikologija** – neigiamo poveikio organizmo vystymuisi, galinčio atsirasti dėl veikimo medžiaga prieš apvaisinimą, prenatalinio vystymosi laikotarpiu arba po gimimo iki lytinės brandos, tyrimas. Pagrindiniai toksiškumo vystymuisi požymiai: 1) organizmo žūtis, 2) struktūros anomalijos, 3) augimo pakitimas ir 4) funkciniai trūkumai. Vystymosi toksikologija anksčiau buvo vadinama teratologija.

**Neigiamas poveikis** – bet koks su veikimu medžiaga susijęs pakitimas, palyginti su pamatine verte, mažinantis organizmo gebą išgyventi, daugintis arba prisitaikyti prie aplinkos. Kalbant apie vystymosi toksikologiją neigiamas poveikis plačiausia prasme yra bet koks poveikis, kuris trukdo apvaisinto kiaušinėlio normaliam vystymuisi, prieš gimimą ir po jo.

**Augimo pakitimas** – palikuonio organo arba kūno masės ar dydžio pakitimas.

**Pakitimai (anomalijos)** – struktūriniai vystymosi pakitimai, kuriuos sudaro išsigimimai ir nukrypimai (28).

**Išsigimimas/didelė anomalija** – struktūrinis pakitimas, laikomas kenksmingu gyvūnui (taip pat gali būti mirtinas), paprastai retas.

**Nukrypimas/maža anomalija** – struktūrinis pakitimas, kurio kenksmingas poveikis gyvūnui yra mažas arba jo visai nėra; gali būti laikinas ir gana dažnai pasitaikyti kontrolinėje populiacijoje.

**Apvaisintas kiaušinėlis** – apvaisinto kiaušinėlio dalių visuma bet kurioje vystymosi stadijoje nuo apvaisinimo iki gimimo, įskaitant ekstraembrionines membranas, gemalą arba vaisių.

**Implantacija (nidacija)** – blastocistos susijungimas su gimdos epitelio gleivine, įskaitant jos prasiskverbimą per gimdos epitelį ir jos įaugimą į gleivinę.

**Gemalas** – visų organizmų ankstyvoji arba vystymosi stadija, tiksliau apvaisinto kiaušinėlio vystymosi produktas nuo didžiosios ašies pasirodymo iki pagrindinių struktūrų atsiradimo.

**Toksiškumas gemalui** – kenksmingas poveikis normaliai gemalo struktūrai, vystymuisi, augimui, ir (arba) gyvybingumui.

**Vaisius** – apvaisintas palikuonis postembrioniniu laikotarpiu.

**Toksiškumas vaisiui** – kenksmingas poveikis normaliai vaisiaus struktūrai, vystymuisi, augimui ir (arba) gyvybingumui.



**Persileidimas** – apvaisinimo produktų – gemalo arba negyvybingo vaisiaus – priešlaikinis pašalinimas iš gimdos.

**Resorbicija** – reiškinys, kai gimdoje implantavęsis apvaisintas kiaušinėlis žūsta ir yra resorbuojamas arba buvo resorbuotas.

**Ankstyvoji resorbicija** – implantacijos pėdsakai be atpažįstamo gemalo ar vaisiaus.

**Vėlyvoji resorbicija** – žuvęs gemalas arba vaisius su išoriniais išsigimimą rodančiais pakitimais.

**NOAEL** – nepastebėto neigiamo poveikio ribos (*No observed adverse effect level*) santrumpa, tai yra didžiausia dozė arba veikimo koncentracija, nesukelianti pastebimo neigiamo poveikio.

### 1.3. ETALONINĖ MEDŽIAGA

Nėra.

### 1.4. BANDYMO METODO PRINCIPAS

Paprastai bandomoji medžiaga duodama vaikingoms patelėms bent nuo implantacijos iki likus vienai parai iki numatyto numaravimo, kuris turi įvykti kiek įmanoma arčiau normalaus atsivedimo dienos, nerizikuojant prarasti duomenis, jei įvyktų priešlaikinis atsivedimas. Bandymų metodas nėra skirtas tik organogenezės laikotarpiui tirti (pvz., 5–15 parų graužikams, 6–18 parų triušiams), juo taip pat tiriama poveikis visą gestacijos laikotarpį nuo ikiimplantacinio laikotarpio, jei tinka, iki likus vienai parai iki cezario pjūvio darymo. Prieš pat cezario pjūvio darymą patelės numarinos, ištiriamas gimdos turinys ir įvertinamos išoriškai matomos vaisiaus anomalijos bei minkštojo audinio ir griaučių pakitimai.

### 1.5. BANDYMO METODO APRAŠYMAS

#### 1.5.1. Gyvūnų rūšies pasirinkimas

Rekomenduojama bandymams pasirinkti tinkamiausią rūšį ir naudoti tas laboratorines rūšis bei veisles, kurios yra paprastai naudojamos darant toksiškumo prenataliniam vystymuisi bandymus. Tinkamiausia graužikų rūšis yra žiurkė, o ne graužikų – triušis. Kitos rūšies naudojimą reikėtų pagrįsti.

#### 1.5.2. Laikymo ir šėrimo sąlygos

Bandomųjų gyvūnų patalpos temperatūra turi būti 22 °C (± 3 °C) graužikams ir 18 °C (± 3 °C) triušiams. Nors santykinė oro drėgmė turėtų būti mažiausiai 30 % ir pageidautina ne didesnė kaip 70 %, išskyrus patalpos plovimo laiką, reikėtų siekti, kad ji būtų 50–60 %. Apšvietimas turi būti dirbtinis ir jo seka: 12 h šviesos ir 12 h tamsos. Gyvūnams šerti tinka įprastas laboratorijoje naudojamas pašaras, o geriamojo vandens kiekis neribojamas.

Poruojama šiam tikslui pritaikytuose narveliuose. Pageidautina suporuotus gyvūnus laikyti atskirai, tačiau taip pat leidžiama juos laikyti nedidelėmis grupėmis.

#### 1.5.3. Gyvūnų paruošimas

Naudojami sveiki ir ankstesniuose bandymuose nenaudoti gyvūnai, kurie mažiausiai 5 paras buvo pratinami prie laboratorinių sąlygų. Apibūdinama bandomų gyvūnų rūšis, veislė, šaltinis, lytis, masė ir (arba) amžius. Kiek įmanoma, visų bandomo grupių gyvūnai turi būti vienodos masės ir amžiaus. Kiekvienai dozei naudojami jaunos, suaugusios palikuonių neturėjusios patelės. Patelės poruojamos su tos pačios rūšies ir veislės patiniais, be to, reikėtų vengti poravimo su tų pačių tėvų palikuonimis. Graužikams 0 gestacijos diena yra vaginalinio kamščio ir (arba) spermos atsiradimo diena; triušiams 0 diena paprastai yra suporavimo arba dirbtinio apvaisinimo diena, jei taikomas šis metodas. Apvaisintos patelės suskirstomos atsitiktiniu būdu į kontrolinę ir bandomąsias grupes. Narveliai išdėstomi taip, kad būtų kiek įmanoma sumažintas bet koks galimas poveikis dėl narvelio buvimo vietos. Kiekvienam gyvūnui turėtų būti priskirtas savitas identifikavimo numeris. Apvaisintos patelės atsitiktinės atrankos būdu paskirstomos į kontrolinę ir bandomo grupes; jei patelės apvaisinamos partijomis, kiekvienos partijos gyvūnai turi būti tolygiai paskirstyti po visas grupes. Patelės, apvaisintos to paties patino, panašiu būdu tolygiai paskirstomos po visas grupes.

**1.6. BANDYMO EIGA****1.6.1. Gyvūnų skaičius ir lytis**

Kiekvienoje bandymo ir kontrolinėje grupėje turi būti pakankamas patelių skaičius, kad darant skrodimą būtų maždaug 20 patelių su implantacijos vietomis. Grupės, kuriose būtų mažiau kaip 16 patelių su implantacijos vietomis, gali netikti. Patelių gaištamumas nebūtinai turi būti bandymo rezultatų negaliojimo priežastis, jei jis nėra didesnis kaip maždaug 10 %.

**1.6.2. Dozių ruošimas**

Jei dozių ruošimui lengvinti naudojamas nešiklis arba kitas priedas, reikėtų atsižvelgti į tokias jo charakteristikas: poveikį absorbcijai, pasiskirstymui, medžiagų apykaitai ir bandomosios medžiagos sulaikymui arba išskyrimui; poveikį bandomosios medžiagos cheminėms savybėms, dėl kurių gali pasikeisti jos toksiškumo charakteristikos; poveikį maisto ar vandens suvartojimui arba gyvūnų ėmitimui. Nešiklis turi neturėti toksiškumo vystymuisi ir dauginimuisi.

**1.6.3. Dozavimas**

Paprastai bandomosios medžiagos reikėtų duoti kasdien nuo implantacijos dienos (pvz., 5 paros po suporavimo) ir baigti dieną prieš numatytą cezario pjūvį. Jei išankstiniai bandymai, jei turimi jų duomenys, nerodo, kad yra didelė ikiimplantacinių nuostolių tikimybė, bandymą galima pratęsti ir įtraukti visą gestacijos laikotarpį nuo suporavimo iki vienos paros prieš numatytą numarinimą. Gerai žinoma, kad netinkamas elgesys su gyvūnais arba stresas gestacijos metu gali būti prenatalinio vados netekimo priežastimi. Siekiant apsaugoti nuo prenatalinio vados netekimo dėl veiksmų, nesusijusių su bandomąja medžiaga, reikėtų be reikalo netrikdyti patelių arba vengti išorinių veiksmų sukeliama streso, pvz., triukšmo.

Turi būti naudojamos mažiausiai trys skirtingų dozių bandomosios grupės ir lygiagrečiai viena kontrolinė grupė. Sveiki gyvūnai paskirstomi atsitiktiniu būdu į kontrolinę ir bandomųjų gyvūnų grupes. Dozės dydžiai turėtų skirtis taip, kad jų toksinį poveikį būtų galima sugraduoti. Jei nėra apribojimų dėl fizikinių ir cheminių arba biologinių bandomosios medžiagos savybių, didžiausia dozė pasirenkama tokia, kad būtų sukeltas tam tikras toksinis poveikis vystymuisi ir (arba) patelei (klinikiniai požymiai arba kūno masės mažėjimas), bet ne žūtį arba sunkias kančias. Mažiausiai viena tarpinė dozė turėtų sukelti mažiausią pastebimą toksinį poveikį. Mažiausia dozė neturėtų sukelti jokio toksinio poveikio patelei arba vaisiaus vystymuisi. Turi būti pasirinkta tokia mažėjanti dozės dydžių seka, kad būtų pastebėtas kiekviena su dozės dydžiu susieta reakcija ir nepastebėto neigiamo poveikio riba (NOAEL). Mažėjančioms dozės dydžio vertėms nustatyti dažnai pakanka dvigubo arba keturgubo koncentracijos skirtumo; tačiau norint naudoti labai didelius intervalus tarp dozių (pvz., daugiklis didesnis kaip 10), dažnai gerai būtų pridėti ketvirtą bandymo grupę. Nors bandymo tikslas – nustatyti patelių NOAEL, gali būti priimtini ir tie bandymai, kuriais tokia dozė nenustatoma (1).

Dozių dydžiai pasirenkami atsižvelgiant į visus turimus toksiškumo duomenis ir papildomą informaciją apie bandomosios medžiagos arba giminingų medžiagų apykaitą ir toksikokinetiką. Be to, ši informacija padės pagrįsti dozavimo režimo tinkamumą.

Lygiagrečiai naudojama kontrolinė grupė. Ši grupė turėtų būti medžiagos negaunanti kontrolinė grupė arba nešiklį gaunanti kontrolinė grupė, jei bandomajai medžiagai duoti naudojamas nešiklis. Visoms grupėms turėtų būti duodamas vienodas bandomosios medžiagos arba nešiklio tūris. Kontrolinės (-ių) grupės (-ių) gyvūnai prižiūrimi tokiau pat būdu, kaip ir bandymo grupės gyvūnai. Nešiklio kontrolinės grupės turėtų gauti nešiklio kiekį, atitinkanti didžiausią naudojamą kiekį (kokį gauna mažiausia dozė veikiama grupė).

**1.6.4. Ribinis bandymas**

Jei darant bandymą pagal šiame bandymo aprašyme nurodytą metodiką su viena per virškinamąjį traktą duodama mažiausiai 1 000 mg/kg kūno masės per parą dozė, toksinis poveikis vaikingai patelei arba jos palikuonims nepastebimas ir jei toks poveikis nenumatomas, atsižvelgiant į turimus duomenis (pvz., giminingos struktūros ir (arba) apykaitos junginių duomenis), nebūtina daryti viso bandymo naudojant tris dozių dydžius. Atsižvelgiant į tikėtiną žmonių sąlytį su medžiaga, ribiniam bandymui gali tekti naudoti didesnes dozes per virškinamąjį traktą. Kalbant apie kitus davimo būdus, pvz., įkvėpimą arba veikimą per odą, bandomosios medžiagos fizikinės ir cheminės savybės dažnai gali lemti ir riboti didžiausią galimą dozę (pvz., dėjimas ant odos neturi sukelti sunkaus vietinio toksinio poveikio).

**1.6.5. Dozių davimas**

Bandomoji medžiaga arba nešiklis paprastai duodamas per virškinamąjį traktą, naudojant zondą. Jei naudojamas kitas davimo būdas, bandymų laboratorija turėtų pagrįsti sprendimą ir nurodyti pasirinkimo priežastis, be to, padaryti atitinkamus būtinus pakeitimus (2)(3)(4). Bandomoji medžiaga turėtų būti duodama kiekvieną dieną maždaug tuo pačiu metu.

Dozė kiekvienam gyvūnui paprastai turėtų būti nustatoma atsižvelgiant į patį paskutinį jo svėrimą. Tačiau reikia atsargiai reguliuoti dozės dydį paskutinį gestacijos trimestrą. Dozė pasirenkama atsižvelgiant į turimus duomenis, kad būtų išvengta per didelio toksinio poveikio patelei. Tačiau jei pastebima, kad toksinis poveikis patelėms yra per didelis, jos turi būti humaniškai numarinamos. Jei per didelio toksiškumo požymiai pasireiškia kelioms vaikingoms patelėms, reikėtų apsvarstyti visos šios dozės grupės numarinimo klausimą. Kai bandomoji medžiaga duodama per zondą, gyvūnams turėtų būti duodama tik viena dozė, naudojant skrandžio zondą arba tinkamą intubacinį vamzdelį. Didžiausias gyvūnui duodamas vienkartinis skysčio tūris priklauso nuo bandomo gyvūno dydžio. Tūris neturi būti didesnis kaip 1 ml/100 g kūno masės, išskyrus vandeninius tirpalus, kurių galima duoti po 2 ml/100 g kūno masės. Jei kaip nešiklis naudojamas kukurūzų aliejus, tūris neturėtų būti didesnis kaip 0,4 ml/100 g kūno masės. Bandomojo tirpalo tūrio nepastovumas turi būti kiek įmanoma sumažintas, keičiant koncentraciją taip, kad visų dozių tūris būtų pastovus.

#### 1.6.6. Patelių stebėjimas

Klinikiniai stebėjimai ir užrašai daromi mažiausiai kartą per dieną, geriau kasdien tuo pačiu laiku, atsižvelgiant į didžiausio laukiamo poveikio pasireiškimo laiką po medžiagos davimo. Užrašoma gyvūnų būklė, įskaitant gaištumą, liguistumą, atitinkamus elgesio pokyčius ir visus akivaizdžius toksiškumo požymius.

#### 1.6.7. Kūno masė ir maisto suvartojimas

Gyvūnai sveriami 0 gestacijos dieną arba ne vėliau kaip 3 gestacijos dieną, jei suporuoti gyvūnai tiekiami iš išorinio veislyno, pirmąją dozavimo dieną, mažiausiai kas 3 dieną dozavimo laikotarpiu ir numatyto numarinimo dieną.

Maisto suvartojimas turėtų būti registruojamas kas tris paras ir turi sutapti su kūno masės nustatymu.

#### 1.6.8. Nekroskopija

Patelės numarinamos dieną prieš numatomą atsivedimą. Patelės, kurioms prieš numatomą numarinimą pasireiškia persileidimo arba priešlaikinio atsivedimo požymiai, turėtų būti numarinamos ir atliekamas išsamus jų makroskopinis tyrimas.

Numarintai arba darant bandymą nugaišusiai patelei turėtų būti daromas makroskopinis tyrimas visoms struktūros anomalijoms arba patologiniams pakitimams nustatyti. Darant cezario pjūvį ir vėlesnį vaisiaus tyrimą, pateles geriau būtų vertinti nežinant bandymo grupės, kad būtų kiek įmanoma sumažintas subjektyvumas.

#### 1.6.9. Gimdos turinio tyrimas

Iš karto po numarinimo arba kiek įmanoma greičiau po patelės nugaišimo gimda išimama ir patvirtinamas gestacijos faktas. Gimdos, kuriose nėra gestacijos požymių, turėtų būti papildomai tiriamos (pvz., graužikų atveju dažant amonio sulfidu arba Salewski metodu arba taikant kitą metodą triušiams) siekiant patvirtinti, kad nėra gestacijos (5).

Gimdos su vaisiumi, įskaitant kaklelį, pasveriamos. Gyvūnų, nugaišusių atliekant bandymą, gimdos su vaisiumi nesveriamos.

Turėtų būti nustatytas vaikingų patelių geltonkūnių (*corpora lutea*) skaičius.

Gimdos turinys tiriamas gemalo arba žuvusių ir gyvybingų vaisių skaičiui nustatyti. Turėtų būti apibūdintas resorbcijos laipsnis, siekiant nustatyti santykinį apvaisinto kiaušinėlio žūties laiką (žr. 1.2 skirsnį).

#### 1.6.10. Vaisių tyrimas

Nustatoma kiekvieno vaisiaus masė ir lytis.

Tiriami kiekvieno vaisiaus išoriniai pakitimai (6).

Reikėtų ištirti vaisiaus griaučių ir minkštųjų audinių pakitimus (pvz., nukrypimus ir išsigimimus arba anomalijas) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (22) (23) (24). Pageidautina, bet

nereikalaujama klasifikuoti vaisiaus pakitimais. Jei daroma klasifikacija, turi būti aiškiai nurodyti kiekvienos kategorijos apibrėžimo kriterijai. Ypatingą dėmesį reikėtų atkreipti į dauginimosi trakto pakitimų požymius.

Kiekvienos graužikų vados pusė paruošiama griaučių pakitimams tirti. Likusi dalis paruošiama minkštų audinių pakitimų tyrimui ir jie tiriama taikant priimtus arba tinkamus serijinių pjūvių metodus arba kruopštaus bendrojo nekroskopijos metodus.

Jei naudojami ne graužikai, pvz., triušiai, tiriama visi vaisiai minkštų audinių ir griaučių pakitimams nustatyti. Vaisių kūnai įvertinami darant išsamią nekroskopiją minkštų audinių pakitimams nustatyti, be to, gali būti įtrauktos metodikos papildomai įvertinti širdies vidinę struktūrą (25). Nupjaunama pusė tokiu būdu ištirtų vaisių galvų, kurios apdorojamos siekiant įvertinti minkštųjų audinių (įskaitant akis, smegenis, nosies kanalus ir liežuvį) pakitimus, taikant standartinius serijinių pjūvių metodus (26) arba tokio paties jautrumo metodą. Šių vaisių kūnai ir likę sveiki vaisiai apdorojami ir tiriama jų griaučių pakitimai, taikant tuos pačius metodus, kurie aprašyti graužikams.

## 2. DUOMENYS

### 2.1. REZULTATŲ APDOROJIMAS

Duomenys pateikiami atskirai apie kiekvieną patelę bei jų palikuonis ir apibendrinami lentelėse, kuriose nurodomas kiekvienos bandymo grupės ir kiekvienos kartos gyvūnų skaičius bandymo pradžioje, darant bandymą nugaivusių arba dėl gyvūnų gerovės priežasčių numarintų gyvūnų skaičius, visų gyvūnų žūties arba numaravimo laikas, vaikingų patelių skaičius, toksiškumo požymių turinčių gyvūnų skaičius, pastebėtų toksiškumo požymių aprašymas, įskaitant pradžios laiką, trukmę ir bet kokio toksinio poveikio sunkumą, atlikti gemalo ar vaisiaus stebėjimo būdai ir visi atitinkami vados duomenys.

Skaitmeniniai rezultatai turi būti įvertinti taikant atitinkamą statistinį metodą, naudojant vadą kaip duomenų analizės statistinį vienetą. Turi būti taikomas visuotinai priimtas statistinis metodas; statistiniai metodai pasirenkami kaip bandymo schemas dalis ir turi būti pagrįsti. Turėtų būti pateikti duomenys apie gyvūnus, kurie neišgyveno iki numatyto numaravimo laiko. Prireikus šie duomenys gali būti naudojami grupių vidutinėms vertėms apskaičiuoti. Duomenų apie tokius gyvūnus tinkamumas ir jų įtraukimas arba neįtraukimas į kurios nors grupės vidurkį (-ius) turi būti pagrįstas ir sprendimas dėl jo priimamas kiekvienu atskiru atveju.

### 2.2. REZULTATŲ ĮVERTINIMAS

Toksiškumo prenataliniam vystymuisi bandymas įvertinamas atsižvelgiant į pastebėtą poveikį. Įvertinimą turi sudaryti ši informacija:

- patelės ir gemalo ar vaisiaus bandymo rezultatai, įskaitant ryšį tarp gyvūno veikimo bandomąja medžiaga ir bet kokio stebimo poveikio dažnumo ir sunkumo, arba tokio ryšio nebuvimą,
- kriterijai, taikyti vaisiaus išorės, minkštųjų audinių ir griaučių pakitimams klasifikuoti, jei buvo klasifikuojama,
- prireikus, ankstesni duomenys apie kontrolinius gyvūnus bandymo rezultatų interpretavimui pagerinti,
- skaičiai, naudoti visoms procentinėms dalims arba rodikliams apskaičiuoti,
- atitinkama bandymo rezultatų statistinė analizė, jei reikia, kurioje pakaktų informacijos apie analizės metodą, kad nepriklausomas ekspertas ar statistikos specialistas galėtų iš naujo įvertinti bei atkurti analizės eigą.

Visuose bandymuose, kuriuos atlikus nepastebėta jokio toksinio poveikio, turėtų būti numatyti papildomi bandymai bandomosios medžiagos absorbcijai ir biologiniam kaupimuisi nustatyti.

### 2.3. REZULTATŲ AIŠKINIMAS

Toksiškumo prenataliniam vystymuisi bandymas suteiks informacijos apie poveikį patelėms gestacijos metu ir jų palikuonių vystymuisi gimdoje dėl kartotinio veikimo medžiaga. Bandymo rezultatus reikėtų interpretuoti atsižvelgiant į rezultatus, gautus darant pusiau lėtinio toksiškumo, toksiškumo dauginimuisi ir toksikokinetinius bandymus. Kadangi akcentuojamas ir bendrasis toksiškumas (toksinis poveikis patelėms), ir toksiškumas

vystymuisi, bandymo rezultatai leis tam tikru laipsniu atskirti poveikį vystymuisi, kai nėra bendro toksiškumo, ir poveikį, kuris sukiamas tik esant koncentracijai, kuri yra toksiška patelei (27).

### 3. ATASKAITOS RENGIMAS

#### 3.1. BANDYMO ATASKAITA

Ataskaitą turi sudaryti ši konkreti informacija:

Bandomoji medžiaga:

- fizikinė būseną ir, jei reikia, fizikės ir cheminės savybės,
- tapatumas, įskaitant CAS numerį, jei žinomas ar priskirtas,
- grynumas.

Nešiklis (jei naudojamas):

- nešiklio pasirinkimo pagrindimas, jei tai ne vanduo.

Bandomieji gyvūnai:

- naudota rūšis ir veislė,
- gyvūnų skaičius ir amžius,
- šaltinis, laikymo sąlygos, pašaras ir t. t.,
- atskirai kiekvieno gyvūno masė bandymo pradžioje.

Bandymo sąlygos:

- dozės koncentracijos pasirinkimo pagrindimas,
- išsami informacija apie bandomosios medžiagos preparato ruošimą arba jos dėjimą į pašarą, gauta koncentracija, preparato stabilumas ir vienalytiškumas,
- išsami informacija apie bandomosios medžiagos davimą,
- bandomosios medžiagos koncentracijos pašare ar geriamajame vandenyje (ppm) perskaičiavimas į tikrąją dozę (mg/kg kūno masės per parą), jei taikoma,
- aplinkos sąlygos,
- išsami informacija apie pašaro ir vandens kokybę.

Rezultatai:

Toksiškumo patelei duomenys atsižvelgiant į dozę, įskaitant šiuos, bet jais neapsiribojant:

- gyvūnų skaičius bandymo pradžioje, išgyvenusių gyvūnų skaičius, vaikingų patelių skaičius, persileidimų ir priešlaikinių atsivedimų skaičius,

- žūties darant bandymą diena arba iki numaravimo išgyvenusių gyvūnų skaičius,
- duomenys apie gyvūnus, neišgyvenusius iki numatyto numaravimo, užregistruojami, bet neįtraukiami į statistinį grupių palyginimą,
- visų anomalijų klinikinių požymių pastebėjimo diena ir jų vėlesnė eiga,
- kūno masė, kūno masės kitimas ir gimdos su vaisiumi masė, įskaitant, neprivalomai, kūno masės kitimą su gimdos su vaisiumi masės pataisa,
- pašaro suvartojimas ir, jei matuotas, vandens suvartojimas,
- nekroskopijos rezultatai, įskaitant gimdos masę,
- NOAEL vertės: poveikio patelei ir poveikio vystymuisi.

Toksiškumo vystymuisi duomenys pagal dozę vadoms su implantais, įskaitant:

- geltonkūnių skaičių,
- implantacijų skaičių, gyvų ir žuvusių vaisių bei resorbcijų skaičių ir procentinę dalį,
- priešimplantacinių ir poimplantacinių nuostolių skaičių ir procentinę dalį.

Toksiškumo vystymuisi duomenys pagal dozę vadoms su gyvais vaisiais, įskaitant:

- gyvų palikuonių skaičių ir procentinę dalį,
- lyčių santykį,
- vaisių kūno masę, pageidautina pagal lytį ir abiejų lyčių kartu,
- išorinius, minkštųjų audinių ir griaučių išsigimimus ir kitus svarbius pakitimus,
- klasifikavimo kriterijus, jei taikomi,
- 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. *Naumyn-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.
- 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, R.E. 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.32. **KANCEROGENIŠKUMO BANDYMAS**1. **METODAS**1.1. **ĮVADAS**

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

1.2. **APIBRĖŽTYS**

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

1.3. **ETALONINĖS MEDŽIAGOS**

Nėra.

1.4. **BANDYMO METODO PRINCIPAS**

Bandomoji medžiaga paprastai duodama septynis kartus per savaitę atitinkamu būdu keletui eksperimentinių gyvūnų grupių, vieną dozę duodant vienai grupei didžiąją gyvūnų gyvenimo dalį. Veikimo bandomąja medžiaga metu ir jam pasibaigus eksperimentiniai gyvūnai stebimi kasdien, siekiant nustatyti toksiškumo požymius, ypač auglių vystymąsi.

1.5. **KOKYBĖS KRITERIJAI**

Nėra.

1.6. **BANDYMO METODO APIBŪDINIMAS**

Prieš bandymą gyvūnai mažiausiai 5 dienas yra laikomi ir šeriami eksperimentinėmis sąlygomis. Prieš pradėdant bandymą sveiki jauni gyvūnai atsitiktinės atrankos būdu atrenkami ir suskirstomi į bandomąją bei kontrolinę grupes.

1.6.1. **Eksperimentiniai gyvūnai**

Remiantis anksčiau atliktų bandymų rezultatais, gali būti naudojamos kitos (graužikų arba negrauzikų) rūšys. Reikėtų naudoti įprastinių laboratorinių veislių jaunos sveikus gyvūnus, o medžiagos davimas turėtų prasidėti iškart po atjunkymo.

Bandyto pradžioje kūno masės variacijos ribos turėtų būti ne didesnės kaip  $\pm 20\%$  kūno masės vidurkio. Jei prieš ilgalaikį bandymą atliekamas pusiau lėtinio toksiškumo per virškinamąjį traktą bandymas, tai abiejų bandymų metu reikėtų naudoti tos pačios rūšies ar veislės gyvūnus.

1.6.2. **Skaičius ir lytis**

Naudojant graužikus kiekvieno dydžio dozė turėtų būti išbandoma su mažiausiai 100 gyvūnų (50 patelių ir 50 patinėlių), taip pat turi būti kontrolinė grupė. Patelės turi būti dar neturėjusios palikuonių ir nevaikingos. Jei numerinimai numatomi iš anksto, bandomųjų gyvūnų skaičius padidinamas tokiu skaičiumi, kiek gyvūnų numatoma numarinti prieš užbaigiant bandymą.

1.6.3. **Dozė ir veikimo dažnumas**

Turėtų būti naudojamos mažiausiai 3 dydžių dozės ir kontrolinė grupė. Didžiausia dozė turėtų sukelti minimalų toksinį poveikį, pasireiškiantį nežymiu kūno masės priaugimo sumažėjimu (mažesniu nei 10%), iš esmės nepažeidžiant įprastinės gyvenimo trukmės dėl kitų nei auglių atsiradimas poveikių.

Mažiausia dozė neturėtų trikdyti gyvūno normalaus augimo, vystymosi bei gyvenimo trukmės ar sukelti toksiškumo. Apskritai, ši dozė neturėtų būti mažesnė nei didelės dozės desimtoji dalis (10%).

Tarpinė(s) dozė(s) turėtų būti išdėstyta (-os) tarp didžiausios ir mažiausios dozių.

Pasirenkant dozes reikėtų remtis anksčiau atliktų toksiškumo bandymų ir tyrimų duomenimis.

Veikimas turėtų būti atliekamas kasdien.

Jei cheminė medžiaga duodama sumaišius ją su vandeniu ar pašaru, ji turėtų būti prieinama visą laiką.

#### 1.6.4. Kontrolė

Kartu reikėtų naudoti kontrolinę grupę, kuri visais atžvilgiais, išskyrus veikimą bandomąja medžiaga, būtų identiška bandomosioms grupėms.

Ypatingais atvejais, tokiais kaip poveikio per kvėpuojamąjį traktą bandymai naudojant aerozolius arba poveikio per virškinamąjį traktą bandymai naudojant nežinomo biologinio aktyvumo emulsiklius, reikėtų taip pat naudoti papildomą kontrolinę grupę, kuri nebūtų veikiamą nešikliu.

#### 1.6.5. Davimo būdas

Pagrindiniai medžiagos davimo būdai – per virškinamąjį traktą, per odą ir per kvėpavimo takus. Davimo būdo pasirinkimas priklauso nuo bandomosios medžiagos fizikinių ir cheminių ypatybių ir nuo tikėtino žmonių sąlyčio su medžiaga būdo.

##### 1.6.5.1. Poveikio per virškinamąjį traktą bandymai

Jei bandomoji medžiaga absorbuojama iš virškinamojo trakto ir jei šis įsisavinimo būdas yra vienas iš būdų, kuriuo žmonės gali būti paveikti bandomąja medžiaga, pasirenkamas medžiagos davimas per virškinamąjį traktą, nebent nustatomos kontraindikacijos. Gyvūnai gali gauti bandomąją 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 praktiniais sumetimais, priimtinas ir dozavimas penkis kartus per savaitę.

##### 1.6.5.2. Poveikio per odą bandymai

Odos veikimas ją nudažant gali būti pasirinktas kaip pagrindinio žmonių sąlyčio su medžiaga imitacija bei kaip odos sutrikimų sukėlimo modelinė sistema.

##### 1.6.5.3. Poveikio per kvėpavimo takus bandymai

Kadangi poveikio per kvėpavimo takus bandymuose iškyla didesnių techninių problemų nei duodant bandomąją medžiagą kitais būdais, čia pateikiamos išsamos instrukcijos, kaip duoti medžiagą šiuo būdu. Reikėtų pažymėti, kad ypatingų situacijų atveju lašinimas į trachėją gali būti alternatyvus problemos sprendimo būdas.

Ilgalaikis veikimas medžiaga dažniausiai modeliuojamas atsižvelgiant į žmonių sąlytį su medžiaga. Gyvūnai veikiami arba kasdien šešias valandas po to, kai suvienodinamos koncentracijos kameros viduje, penkis kartus per savaitę (protarpinis veikimas) arba, atsižvelgiant į galimą veikimą per aplinką, veikiami 22–24 valandas per dieną septynis kartus per savaitę (nuolatinis veikimas) ir veikimas pertraukiamas tik vienai valandai, kol gyvūnai pašeriami ir sutvarkoma kamera. Abiem atvejais gyvūnai veikiami nustatyto dydžio bandomosios medžiagos koncentracijomis. Pagrindinis protarpinio ir nuolatinio veikimo būdų skirtumas yra tas, kad veikiant protarpiais kasdien susidaro 17–18 valandų intervalai, per kuriuos gyvūnai gali atsigauti po kasdienio veikimo poveikio, o savaitgalį šis intervalas dar ilgesnis.

Kuris veikimo būdas - protarpinis ar nuolatinis - bus pasirinktas, priklauso nuo bandymo tikslų bei nuo imituojamo žmogaus sąlyčio su medžiaga. Tačiau reikia apsvarstyti ir konkrečius techninius sunkumus. Pavyzdžiui, nuolatinio veikimo, kuriuo simuliuojamos aplinkos sąlygos, teikiamus privalumus gali atsverti tai, kad veikimo metu gyvūnus reikia šerti ir girdyti ir dėl to, kad reikia naudoti daug sudėtingesnius (bei patikimesnius) aerozolio ir garų sukūrimo ir kontrolės metodus.

#### 1.6.6. Veikimo kamera

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 veikimo atmosfera. Kontrolinė kamera ir toji, kurioje atliekamas veikimas, turėtų būti identiškos pagal konstrukciją ir modelį tam, kad veikimo sąlygos būtų palyginamos visais aspektais, išskyrus veikimą bandomąja medžiaga. Nežymus neigiamas slėgis kameros viduje paprastai palaikomas tam, kad bandomoji medžiaga nepatektų į supančią aplinką. Bandomieji gyvūnai kameroje turėtų būti nesusigrūdę. Siekiant užtikrinti kameros oro stabilumą, tūris, kurį užima bandomieji gyvūnai, neturėtų viršyti 5 % bandymui naudojamos kameros tūrio.

Turėtų būti matuojama arba stebima:

- i) oro srautas: oro srauto, patenkančio per kamerą, greitis turi būti nuolat kontroliuojamas;
- ii) koncentracija: kasdieninio veikimo metu bandomosios medžiagos koncentracija neturėtų būti didesnė kaip  $\pm 15\%$  vidutinės vertės. Viso bandymo laikotarpiu reikėtų išlaikyti kasdienes koncentracijas, jei tai praktiškai įmanoma padaryti;
- iii) temperatūra ir drėgmė: graužikų atveju turėtų būti palaikoma  $22 \pm 2$  °C temperatūra ir drėgmė kameroje turėtų siekti nuo 30 % iki 70 %, išskyrus tą atvejį, kai naudojamas vanduo tam, kad bandomoji medžiaga virstų suspensija kameros atmosferoje. Reikėtų nuolat stebėti temperatūrą bei drėgmę;
- iv) dalelių dydžio matavimai: reikėtų nustatyti kameros atmosferoje esančių dalelių dydžio pasiskirstymą, kai naudojami skysčiai ir kietųjų dalelių aerosoliai. Aerosolių dalelės turėtų būti tokio dydžio, kad naudojamas bandomasis gyvūnas jas galėtų įkvėpti. Kameros atmosferos mėginiai turėtų būti imami gyvūnų įkvėpimo zonoje. Oro mėginys, remiantis gravimetrine analize, turėtų atspindėti dalelių, kuriomis gyvūnai veikiami, pasiskirstymą ir visus aerosolius, esančius suspensijoje, netgi jei didžioji aerosolio dalis nėra įkvepiama. Dalelių dydį reikėtų nustatinėti kaip galima dažniau kuriant sistemą tam, kad būtų užtikrintas aerosolio stabilumas ir po to kuo dažniau veikimų metu tam, kad būtų galima tinkamai nustatyti dalelių, kuriomis gyvūnai veikiami, pasiskirstymą.

#### 1.6.7. Bandymo trukmė

Kancerogeniškumo bandymas trunka didžiąją bandomųjų gyvūnų gyvenimo dalį. Pelių ir žiurkėnų atveju bandymą reikėtų baigti po 18 mėnesių, o žiurkių atveju – po 24 mėnesių; tačiau konkrečių gyvūnų atmainų, kurių gyvenimo trukmė yra ilgesnė, atveju ir (arba) jei augliai vystosi lėčiau, bandymą reikėtų baigti po 24 mėnesių (su pelėmis ir žiurkėnais) ir po 30 mėnesių (su žiurkėmis). Kitas variantas – tokį pratęstą bandymą baigti, kai kontrolinėje ir mažiausios dozės grupėse lieka 25 % gyvūnų. Jei baigiamas bandymas, kurio metu nustatytas aiškus lyčių skirtumas pagal atsaką, kiekviena lytis apsvairstoma atskirai. Jei dėl akivaizdžių toksiškumo priežasčių anksčiau laiko išgaišta tik didžiausią dozę gavusi grupė, bandymo nebūtina baigti, jei toksiškos reakcijos nekelia problemų kitoms bandomosioms grupėms. Neigiamas bandymo rezultatas priimtinas tada, kai ne daugiau kaip 10 % bet kurios grupės gyvūnų nugaišta eksperimento metu dėl autolizės, kanibalizmo ar laikymo sąlygų, o po 18 mėnesių išlieka ne mažiau kaip 50 % gyvūnų visose pelių ir žiurkėnų grupėse po 24 mėnesių – ne mažiau kaip 50 % gyvūnų visose žiurkių grupėse.

#### 1.6.8. Bandymo eiga

##### 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 aktyvumo ir elgsenos pakitimų stebėjimus.

Reguliariai stebėti gyvūnus būtina siekiant užtikrinti, kad gyvūnai nebūtų prarandami bandymo metu dėl tokių priežasčių kaip kanibalizmas, audinių autolizė ar netinkama laikymo vieta. Kai pastebimi gaištantys gyvūnai, jie pašalinami ir atliekama jų nekroskopija.

Reikėtų registruoti visų gyvūnų klinikinius požymius bei gaištamumą. Ypatingas dėmesys turi būti skiriamas auglių vystymuisi: turėtų būti registruojamas kiekvieno akivaizdžiai matomo bei užčiuopiamo auglio pasireiškimo laikas, vieta, matmenys ir išvaizda, ir vystymosi eiga.

Pirmąsias 13 bandymo savaitių reikėtų nustatyti įsisavinamą pašaro (ir vandens, jei bandomoji medžiaga duodama su geriamuoju vandeniu) kiekį ir vėliau tai daryti maždaug kas tris mėnesius, nebent dėl sveikatos būklės ar kūno masės pokyčių reikėtų elgtis kitaip.

Pirmąsias 13 bandymo savaitių bent vieną kartą per savaitę reikėtų pasverti visus gyvūnus. O po to tai daryti bent kas keturias savaites.

#### 1.6.8.2. *Klinikiniai tyrimai*

##### Hematologinis tyrimas

Jei, remiantis laikomų narveliuose gyvūnų stebėjimais, spėjama, kad bandymo metu pablogėjo gyvūnų sveikata, turi būti atliekama atitinkamų gyvūnų diferencinė kraujo analizė.

Praėjus 12 mėnesių, 18 mėnesių ir prieš numarinimą iš gyvūnų paimami kraujo tepinėliai. Kraujo diferencinė analizė atliekama gyvūnams, gavusiems didžiausią medžiagos dozę, bei kontrolinės grupės gyvūnams. Jei šie duomenys, ypač tie, kurie buvo gauti prieš numarinimą arba patologinių tyrimų duomenys rodo, kad reikia ištirti kraują, tai atliekama grupės, gavusios vienu dydžiu mažesnę dozę, diferencinė kraujo analizė.

##### Bendroji nekroskopija

Turėtų būti atlikta visapusiška bendra visų gyvūnų nekroskopija, įskaitant tuos, kurie nugaišo eksperimento metu arba buvo numarinti tada, kai buvo nustatyta, jog jie gaišta. 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, trachėja ir plaučiai, širdis, aorta, seilių liaukos, kepenys, blužnis, inkstai, antinksčiai, kasa, lytinės liaukos, gimda pagalbiniai lytiniai organai, oda, stemplė, skrandis, dvylikapirštė žarna, tuščioji žarna, klubinė žarna, akloji žarna, tiesioji žarna, riestoji žarna, šlapimo pūslė, pagrindinis limfmazgis, patelių pieno liauka, šlaunies raumenynas, periferinis nervas, krūtinkaulis su kaulų čiulpais, šlaunikaulis, įskaitant sąnarį, stuburo smegenys trimis lygiais – sprando, krūtinės ląstos ir juosmens ir akys.

Plaučių ir šlapimo pūslės pripildymas fiksuojančiąja medžiaga yra optimalus būdas išsaugoti šiuos audinius; plaučių pripildymas poveikio per kvėpavimo takus bandymuose yra būtinas, kad būtų galima atlikti tinkamus histopatologinius tyrimus. Poveikio per kvėpavimo takus bandymų atveju reikėtų užkonservuoti visą kvėpuojamąjį traktą, įskaitant nosies ertmę, gerklą ir ryklę.

##### Histopatologinis tyrimas

- a) Reikėtų atlikti visų gyvūnų, kurie nugaišo arba buvo numarinti bandymo metu, ir visų kontrolinės bei gavusios didelę dozę grupių gyvūnų visą histopatologinę analizę.
- b) Reikėtų mikrosopiškai ištirti visų grupių gyvūnų akivaizdžiai matomus auglius ar sutrikimus, kurie, kaip įtariama, gali būti augliai.
- c) Jei gavusios didelę dozę ir kontrolinė grupės labai skiriasi pagal neoplastinių sutrikimų pasireiškimą, reikėtų ištirti visų grupių gyvūnų tą konkretų organą arba audinį.
- d) Jei gavusios didelę dozę grupės gyvūnų išgyvenamumas ypač skiriasi nuo kontrolinės grupės, tai reikėtų išsamiai ištirti vienu dydžiu mažesnę dozę gavusią grupę.
- e) Jei yra įrodymų, kad didelę dozę gavusiems gyvūnams sukeltas toksinis ar kitoks poveikis, kuris gali turėti įtakos neoplastiniam atsakui, reikėtų išsamiai ištirti vienu dydžiu mažesnę dozę gavusią grupę.

## 2. **DUOMENYS**

Duomenys turėtų būti apibendrinami lentelėse, kuriose nurodomas kiekvienos bandomosios grupės gyvūnų skaičius bandymo pradžioje, gyvūnų, kuriuose buvo pastebėti augliai bandymo metu, skaičius, ir tų auglių nustatymo laikas, taip pat gyvūnų, kuriuose buvo nustatyti augliai po numarinimo, skaičius. Rezultatus reikėtų vertinti atitinkamu statistiniu metodu. Galima naudoti bet kokią visuotinai pripažintą statistinį metodą.

### 3. ATASKAITA

#### 3.1. BANDYMO ATASKAITA

Jei įmanoma, bandymo ataskaitoje turėtų būti pateikiama tokia informacija:

- rūšis, veislė, šaltinis, aplinkos sąlygos, pašaras,
- bandymo sąlygos:

Aparato, kuris naudojamas veikimui medžiaga, aprašymas

Įskaitant konstrukciją, tipą, išmatavimus, oro šaltinį, dalelių ir aerosolių sukūrimo sistemą, vėdinimo metodą, iškvėpto oro apdorojimo būdą ir gyvūnų laikymo bandymo kameroje, kai ji naudojama, būdą. Reikėtų aprašyti temperatūros, drėgmės ir, jei reikia, aerosolių koncentracijų arba dalelių dydžio stabilumo matavimo prietaisus.

Veikimo duomenys

Duomenys turėtų būti pateikiami lentelėse, nurodant vidurkius ir variacijos dydį (pvz., standartinį nukrypimą) ir pateikiant:

- a) oro srauto, pereinančio per inhaliacinę įrangą, greičius;
  - b) oro temperatūrą ir drėgmę;
  - c) nominalias koncentracijas (absolūtus inhaliacinėje įrangoje esančios bandomosios medžiagos kiekis, padalytas iš oro tūrio);
  - d) nešiklio, jei jis naudojamas, pobūdį;
  - e) faktines koncentracijas, esančias bandomoje kvėpuojamoje zonoje;
  - f) vidutinius dalelių dydžius (jei įmanoma nurodyti):
- dozių dydžiai (įskaitant nešiklį, jei naudotas) ir koncentracijos,
  - auglių pasireiškimas pagal lytį, dozę ir auglių tipus,
  - nugaišimo laikas bandymo metu arba informacija, kad gyvūnai išgyveno iki numarinimo,
  - duomenys apie toksinį atsaką pagal lytį ir dozės dydį,
  - toksinio ir kitokio poveikio apibūdinimas,
  - kiekvienas anomalijos pastebėjimo momentas ir jos tolesnė eiga,
  - duomenys apie pašarą bei kūno masę,
  - naudoti hematologiniai tyrimai ir visi jų metu gauti rezultatai,
  - nekroskopijos metu gauti duomenys,
  - visų histopatologinių tyrimų metu gautų duomenų išsamus apibūdinimas,

- rezultatų statistinė analizė ir statistinių metodų apibūdinimas,
- rezultatų aptarimas,
- rezultatų aiškinimas.

### 3.2. ĮVERTINIMAS IR AIŠKINIMAS

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

### 4. NUORODOS

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

**B.33. KOMBINUOTAS LĒTINIO TOKSIŠKUMO IR KANCEROGENIŠKUMO BANDYMAS****1. METODAS****1.1. ĮVADAS**

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

**1.2. APIBRĖŽTYS**

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

**1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS**

Nėra.

**1.4. BANDYMO METODO PRINCIPAS**

Kombinuotu lėtinio toksiškumo ir kancerogeniškumo bandymu siekiama nustatyti medžiagos lėtinį ir kancerogeninį poveikį žinduoliams veikiant juos ilgą laikotarpį.

Todėl atliekant kancerogeniškumo bandymą naudojama mažiausiai dar viena papildoma grupė, kuri veikiama bandomąja medžiaga, ir dar viena papildoma kontrolinė grupė. Dozė, kuri duodama papildomai didele doze veikiama grupei, gali būti didesnė nei ta, kuri duodama didžiausios dozės grupei kancerogeniškumo bandymo metu. Kancerogeniškumo bandyme naudojami gyvūnai išbandomi tiek siekiant nustatyti bendrą toksinį poveikį, tiek kancerogeninį atsaką. Papildomos grupės, veikiamos bandomąja medžiaga, gyvūnai bandomi siekiant nustatyti bendrą toksinį poveikį.

Bandomoji medžiaga paprastai duodama septynis kartus per savaitę atitinkamu būdu keletui eksperimentinių gyvūnų grupių, vieną dozę duodant vienai grupei, didžiąją gyvūnų gyvenimo dalį. Veikimo bandomąja medžiaga metu ir jam pasibaigus eksperimentiniai gyvūnai stebimi kasdien, siekiant nustatyti toksiškumo požymius bei auglių vystymąsi.

**1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI**

Nėra.

**1.6. BANDYMO METODO APIBŪDINIMAS**

Prieš bandymą gyvūnai mažiausiai 5 dienas yra laikomi ir šeriami eksperimentinėmis sąlygomis. Prieš pradėdant bandymą sveiki jauni gyvūnai atsitiktinai suskirstomi į bandomąsias bei kontrolinę (-es) grupes.

**1.6.1. Eksperimentiniai gyvūnai**

Tinkamiausia rūšis yra žiurkės. Remiantis anksčiau atliktų bandymų duomenimis, gali būti naudojamos ir kitos (graužikų arba negrauzikų) rūšys. Reikėtų naudoti įprastinių laboratorinių veislių gyvūnų sveikus jauniklius, medžiagos davimas turėtų prasidėti iškart po atjunkymo.

Bandymo pradžioje gyvūnų kūno masės įvairovė turėtų būti ne didesnė kaip  $\pm 20\%$  kūno masės vidurkio. Jei prieš ilgalaikį bandymą yra atliekamas pusiau ūmaus poveikio per virškinamąjį traktą bandymas, abiejų bandymų metu reikėtų naudoti tos pačios rūšies ar veislės gyvūnus.

**1.6.2. Skaičius ir lytis**

Naudojant graužikus kiekvieno dydžio dozė turėtų būti išbandoma su mažiausiai 100 gyvūnų (50 patelių ir 50 patinėlių), taip pat turi būti kontrolinė grupė. Patelės turi būti dar neturėjusios palikuonių ir nevaikingos. Jei numarinimai numatomi iš anksto, bandomųjų gyvūnų skaičius padidinamas tokiu skaičiumi, kiek gyvūnų numatoma numarinti prieš užbaigiant bandymą.

Papildomoje bandomojoje grupėje, skirtoje patologiniam tyrimui, turėtų būti po 20 kiekvienos lyties gyvūnų, o papildomoje kontrolinėje grupėje turėtų būti po 10 kiekvienos lyties gyvūnų.

#### 1.6.3. **Dozė ir veikimo dažnis**

Turėtų būti naudojamos mažiausiai 3 dydžių dozės ir kontrolinė grupė. Didžiausia dozė turėtų sukelti minimalų toksinį poveikį, pasireiškiantį nežymiu kūno masės priaugimo sumažėjimu (mažesniu nei 10 %), iš esmės nepažeidžiant įprastinės gyvenimo trukmės dėl kitų nei auglių atsiradimas poveikių.

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(s) dozė(s) turėtų būti išdėstyta (-os) tarp didžiausios ir mažiausios dozių.

Pasirenkant dozes reikėtų remtis anksčiau atliktų toksiškumo bandymų ir tyrimų duomenimis.

Atliekant lėtinio toksiškumo bandymą naudojamos papildomos bandomosios ir kontrolinė grupės. Didelė dozė, duodama papildomos bandomosios grupės gyvūnams, turėtų sukelti aiškius toksiškumo požymius.

Veikimas turėtų būti atliekamas kasdien.

Jei cheminė medžiaga duodama, sumaišius ją su vandeniu ar pašaru, ji turėtų būti prieinama visą laiką.

#### 1.6.4. **Kontrolė**

Kartu reikėtų naudoti kontrolinę grupę, kuri visais atžvilgiais, išskyrus veikimą bandomąja medžiaga, būtų identiška bandomosioms grupėms.

Ypatingais atvejais, tokiais kaip poveikio per kvėpuojamąjį traktą bandymai naudojant aerozolius arba poveikio per virškinamąjį traktą bandymai naudojant nežinomo biologinio aktyvumo emulsiklius, reikėtų taip pat naudoti papildomą kontrolinę grupę, kuri nebūtų veikiamą nešikliu.

#### 1.6.5. **Davimo būdas**

Pagrindiniai medžiagos davimo būdai – per virškinamąjį traktą, per odą ir per kvėpavimo takus. Davimo būdo pasirinkimas priklauso nuo bandomosios medžiagos fizikinių ir cheminių ypatybių ir nuo tikėtino žmonių sąlyčio su medžiaga būdo.

##### 1.6.5.1. *Poveikio per virškinamąjį traktą bandymai*

Jei bandomoji medžiaga absorbuojama iš virškinamojo trakto ir jei šis įsisavinimo būdas yra vienas iš būdų, kuriuo žmonės gali būti paveikti bandomąja medžiaga, pasirenkamas medžiagos davimo per virškinamąjį traktą, nebent nustatomos kontraindikacijos. Gyvūnai gali gauti bandomąją 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 praktiniais sumetimais, priimtinas ir dozavimas penkis kartus per savaitę.

##### 1.6.5.2. *Poveikio per odą bandymai*

Odos veikimas ją nudažant gali būti pasirinktas kaip pagrindinio žmonių sąlyčio su medžiaga imitacija bei kaip odos sutrikimų sukėlimo modelinė sistema.



#### 1.6.5.3. *Poveikio per kvėpavimo takus bandymai*

Kadangi poveikio per kvėpavimo takus bandymuose iškyla didesnių techninių problemų nei duodant bandomąją medžiagą kitais būdais, čia pateikiamos išsamios instrukcijos, kaip duoti medžiagą šiuo būdu. Reikėtų pažymėti, kad ypatingų situacijų atveju lašinimas į trachėją gali būti alternatyvus problemos sprendimo būdas.

Ilgalaikis veikimas medžiaga dažniausiai modeliuojamas atsižvelgiant į tai, kaip žmonės gali būti paveikiami medžiaga. Gyvūnai veikiami arba kasdien šešias valandas po to, kai suvienodinamos koncentracijos kameros viduje, penkis kartus per savaitę (protarpinis veikimas) arba, atsižvelgiant į galimą veikimą per aplinką, veikiami 22–24 valandas per dieną septynis kartus per savaitę (nuolatinis veikimas) ir veikimas pertraukiamas tik vienai valandai, kol gyvūnai pašeriami ir sutvarkoma kamera. Abiem atvejais gyvūnai veikiami nustatyto dydžio bandomosios medžiagos koncentracijomis. Pagrindinis protarpinio ir nuolatinio veikimo būdų skirtumas yra tas, kad veikiant protarpiais kasdien susidaro 17–18 valandų intervalai, per kuriuos gyvūnai gali atsigaivinti po kasdienio veikimo poveikio, o savaitgalį šis intervalas dar ilgesnis..

Kuris veikimo būdas - protarpinis ar nuolatinis - bus pasirinktas, priklauso nuo bandymo tikslų bei nuo imituojamo žmogaus sąlyčio su medžiaga. Tačiau reikia apsvarstyti ir konkrečius techninius sunkumus. Pavyzdžiui, nuolatinio veikimo, kuriuo simuliuojamos aplinkos sąlygos, teikiamus privalumus gali atsverti tai, kad veikimo metu gyvūnus reikia šerti ir girdyti ir dėl to, kad reikia naudoti daug sudėtingesnius (bei patikimesnius) aerozolio ir garų sukūrimo ir kontrolės metodus.

#### 1.6.6. **Veikimo kamera**

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 veikimo atmosfera. Kontrolinė kamera ir toji, kurioje atliekamas veikimas, turėtų būti identiškos pagal konstrukciją ir modelį tam, kad veikimo sąlygos būtų palyginamos visais aspektais, išskyrus veikimą bandomąja medžiaga. Nežymus neigiamas slėgis kameros viduje paprastai palaikomas tam, kad bandomoji medžiaga nepatektų į supančią aplinką. Bandomieji gyvūnai kameroje turėtų būti nesusigrūdę. Siekiant užtikrinti kameros oro stabilumą, tūris, kurį užima bandomieji gyvūnai, neturėtų viršyti 5 % bandymui naudojamos kameros tūrio.

Turėtų būti matuojama arba stebima:

- i) oro srautas: oro srauto, patenkančio per kamerą, greitis turi būti nuolat stebimas;
- ii) koncentracija: kasdieninio veikimo metu bandomosios medžiagos koncentracija neturėtų viršyti  $\pm 15$  % vidutinės vertės. Viso bandymo laikotarpiu reikėtų stengtis, kad koncentracijos būtų palaikomos kaip galima stabilesnės kiekvieną dieną, jei tai įmanoma praktiškai;
- iii) temperatūra ir drėgmė: graužikų atveju turėtų būti palaikoma  $22 \pm 2$  °C temperatūra ir drėgmė kameroje turėtų siekti nuo 30 % iki 70 %, išskyrus tą atvejį, kai naudojamas vanduo tam, kad bandomoji medžiaga virstų suspensija kameros atmosferoje. Reikėtų nuolat stebėti temperatūrą bei drėgmę;
- iv) dalelių dydžio matavimai: reikėtų nustatyti kameros atmosferoje esančių dalelių dydžio pasiskirstymą, kai naudojami skysčiai ir kietųjų dalelių aerozoliai. Aerozolių dalelės turėtų būti tokio dydžio, kad naudojamas bandomasis gyvūnas jas galėtų įkvėpti. Kameros atmosferos mėginiai turėtų būti imami gyvūnų įkvėpimo zonoje. Oro mėginys, remiantis gravimetrine analize, turėtų atspindėti dalelių, kuriomis gyvūnai veikiami, pasiskirstymą ir visus aerozolių, esančių 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. **Bandymo trukmė**

Kancerogeninio poveikio bandymas trunka didžiąją bandomųjų gyvūnų gyvenimo dalį. Pelių ir žiurkėnų atveju bandymą reikėtų baigti po 18 mėnesių, o žiurkių atveju – po 24 mėnesių; tačiau konkrečių gyvūnų atmainų, kurių gyvenimo trukmė yra ilgesnė, atveju ir (arba) jei augliai vystosi lėčiau, bandymą reikėtų baigti po 24 mėnesių (su pelėmis ir žiurkėmis) ir po 30 mėnesių (su žiurkėmis). Kitas variantas – tokį pratęstą bandymą baigti, kai kontrolinėje ir mažiausios dozės grupėse lieka 25 % gyvūnų. Jei baigiamas bandymas, kurio metu nustatytas aiškus lyčių skirtumas pagal atsaką, kiekviena lytis apsvartoma atskirai. Jei dėl akivaizdžių toksinio poveikio priežasčių anksčiau laiko išgaišta tik didžiausią dozę gavusi grupė, bandymo nebūtina baigti, jei toksinės reakcijos nekelia problemų kitoms bandomosioms grupėms. Neigiamas bandymo rezultatas priimtinas tada, kai ne daugiau kaip 10 % bet kurios grupės gyvūnų nugaista eksperimento metu dėl autolizės, kanibalizmo ar laikymo

sąlygų, o po 18 mėnesių išlieka ne mažiau kaip 50 % gyvūnų visose pelių ir žiurkėnų grupėse po 24 mėnesių – ne mažiau kaip 50 % gyvūnų visose žiurkių grupėse.

Atliekant lėtinio toksiškumo bandymą mažiausiai 12 mėnesių naudojamos papildomos grupės: bandomoji grupė, sudaryta iš 20 kiekvienos lyties gyvūnų, ir kontrolinė grupė, sudaryta iš 10 kiekvienos lyties gyvūnų. Turėtų būti sudarytas gyvūnų numarinimo grafikas siekiant, kad bandomosios medžiagos sukeltus patologinius procesus būtų galima iširti be gyvūnų senėjimo sukeltų komplikacijų.

#### 1.6.8. **Bandymo eiga**

##### 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 aktyvumo ir elgsenos pakitimų stebėjimus. Tinkamais intervalais turėtų būti atliekamas papildomos bandomosios grupės gyvūnų kliniškinis ištyrimas.

Reguliariai stebėti gyvūnus būtina siekiant užtikrinti, kad gyvūnai nebūtų prarandami bandymo metu dėl tokių priežasčių kaip kanibalizmas, audinių autolizė ar netinkama laikymo vieta. Kai pastebimi gaištantys gyvūnai, jie pašalinami ir atliekama jų nekroskopija.

Reikėtų registruoti visų gyvūnų kliniškinis požymius, įskaitant neurologinius ir akių pakitimus, bei gaištamumą. Ypatingas dėmesys turi būti skiriamas auglių vystymuisi: turėtų būti registruojamas kiekvieno akivaizdžiai matomo bei užčiuopiamo auglio pasireiškimo laikas, vieta, matmenys ir išvaizda; reikėtų registruoti toksiškumo požymių pasireiškimo laiką bei eigą.

Pirmąsias 13 bandymo savaitių reikėtų nustatyti įsisavinamą pašaro (ir vandens, jei bandomoji medžiaga duodama su geriamuoju vandeniu) kiekį ir vėliau tai daryti maždaug kas tris mėnesius, nebent dėl sveikatos būklės ar kūno masės pokyčių reikėtų elgtis kitaip.

Pirmąsias 13 bandymo savaitių bent vieną kartą per savaitę reikėtų pasverti visus gyvūnus. O po to tai daryti bent kas keturias savaites.

##### 1.6.8.2. *Kliniškiniai tyrimai*

###### Hematologinis tyrimas

Praėjus trimis, šešiams mėnesiams, o paskui kas pusę metų ir bandymo pabaigoje atliekamas kiekvienos grupės dešimties kiekvienos lyties žiurkių kraujo mėginių hematologinė analizė (nustatant hemoglobino kiekį, eritrocitų užimamą tūrį kraujyje, absoliutų eritrocitų, leukocitų ir trombocitų skaičių arba kitus rodiklius kraujo krešėjimo aktyvumui įvertinti). Jei įmanoma, kraujo mėginiai imami iš tų pačių žiurkių tokiais pačiais laiko intervalais.

Jei, remiantis laikomų narveliuose gyvūnų stebėjimais, spėjama, kad bandymo metu pablogėjo gyvūnų sveikata, turi būti atliekama atitinkamų gyvūnų diferencinė kraujo analizė. Taip pat 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 nustatoma, kad yra didelių skirtumų tarp didžiausią dozę gavusios ir kontrolinės grupės kraujo mėginių arba diferencinės analizės poreikis išskyla atlikus patologinius tyrimus.

###### Šlapimo analizė

Reikėtų surinkti šlapimo mėginius iš kiekvienoje grupėje esančių 10 kiekvienos lyties žiurkių, jei įmanoma, tų pačių žiurkių, kurios naudotos hematologiniam tyrimui, ir tokiais pačiais laiko intervalais kaip imta hematologiniam tyrimui. Reikėtų atlikti kiekvieno gyvūno arba bendro konkrečios grupės konkrečios lyties gyvūnų mėginių rinkinio tokius tyrimus:

- išvaizda: individualaus gyvūno šlapimo tūris bei tankis,
- baltymų, gliukozės, ketonų, paslėpto kraujo kiekis (pusiau kiekybiškai),
- nuosėdų mikroskopinis vaizdas (pusiau kiekybiškai).

### Klinikiniai cheminiai tyrimai

Maždaug kas šešis mėnesius ir bandymo pabaigoje iš visų negrauzikų bei 10 kiekvienos lyties kiekvienos grupės žiurkių, jei įmanoma, iš tų pačių žiurkių tokiais pačiais laiko tarpais, 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 bandymas, glutamino piruvato transaminazės <sup>(1)</sup> aktyvumo nustatymo bandymas ir glutamato oksalacetato transaminazės <sup>(2)</sup> aktyvumo nustatymo bandymas), gama glutamiltranspeptidazė, ornitino dekarboksilazė,
- angliavandenių metabolizmas, įvertinant gliukozės kraujyje trūkumą,
- inkstų funkciniai testai, tokie kaip šlapalo nustatymas kraujyje.

### Bendroji nekroskopija

Turėtų būti atlikta visapusiška bendra visų gyvūnų nekroskopija, įskaitant tuos kurie nugaišo bandymo metu arba buvo numarinti tada, kai buvo nustatyta, jog jie gaišta. Prieš numarinimą turėtų būti paimti visų gyvūnų kraujo mėginiai tam, kad būtų atlikta diferencinė kraujo analizė. Visi akivaizdžiai matomi pažeidimai, augliai ar pažeidimai, 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 <sup>(3)</sup> (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 <sup>(3)</sup>, blužnis, inkstai <sup>(3)</sup>, antinksčiai <sup>(3)</sup>, stemplė, skrandis, dvylikapirštė žarna, tuščioji žarna, klubinė žarna, akloji žarna, tiesioji žarna, riestoji žarna, šlapimo pūslė, limfmazgiai, kasa, lytinės liaukos <sup>(3)</sup>, pagalbiniai lytiniai organai, patelių pieno liauka, oda, raumenynas, periferinis nervas, stuburo smegenys (sprando, krūtinės ąstos ir juosmens), krūtinkaulis su kaulų čiulpais, šlaunikaulis (įskaitant sąnari) ir akys.

Nors plaučių ir šlapimo pūslės pripildymas fiksuojančiąja medžiaga yra optimalus būdas išsaugoti šiuos audinius; plaučių pripildymas poveikio per kvėpavimo takus bandymuose yra privalomas siekiant tinkamai atlikti histopatologinius tyrimus. Specialių bandymų, tokių kaip poveikio per kvėpavimo takus bandymai 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 prieš atliekant mikroskopinę analizę, nes ta informacija gali būti svarbi patologui.

### Histopatologinis tyrimas

Bandymo dalis, skirta lėtiniam toksiškumui ištirti:

Reikėtų išsamiai ištirti visų didelę dozę gavusios papildomos grupės ir kontrolinės grupės gyvūnų užkonservuotus organus. Jei tiriant didelę dozę gavusią papildomą grupę nustatomi su bandomąja medžiaga susiję tam tikrų organų patologiniai pokyčiai, reikia histologiniu aspektu ištirti visų kitų papildomų bandomųjų grupių gyvūnų atitinkamus organus, o pabaigus kancerogeninio poveikio bandymą, ir šios bandymo dalies gyvūnų, kurie veikti bandomąja medžiaga atitinkamus organus..

Bandymo dalis, skirta kancerogeniniam poveikiui ištirti:

- a) reikėtų atlikti visų gyvūnų, kurie nugaišo arba buvo numarinti bandymo metu ir kontrolinės bei gavusių didelę dozę grupių gyvūnų visų organų histopatologinę analizę;

<sup>(1)</sup> Dabar žinoma kaip serumo alanino aminotransferazė.

<sup>(2)</sup> Dabar žinoma kaip serumo aspartato aminotransferazė.

<sup>(3)</sup> šie organai, paimti iš 10 kiekvienos lyties ir visų grupių graužikų, turėtų būti pasverti.

- 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, reikėtų ištirti atitinkamus šių grupių organus ar audinius;
- d) jei gavusios didelę dozę grupės gyvūnų išgyvenamumas ypač skiriasi nuo kontrolinės grupės, reikėtų išsamiai ištirti vienu dydžiu mažesnę dozę gavusią grupę;
- e) jei egzistuoja įrodymai, kad toksiniai ar kiti poveikiai galėjo sukelti neoplastinį atsaką grupėje, gavusioje didelę dozę, reikėtų išsamiai ištirti vienu dydžiu mažesnę dozę gavusią grupę.

## 2. DUOMENYS

Duomenys turėtų būti apibendrinti lentelėse, nurodant kiekvienos bandomosios grupės gyvūnų skaičių bandymo pradžioje ir gyvūnų, kuriems nustatyti augliai arba toksinis poveikis bandymo metu, skaičių, jų aptikimo laiką ir gyvūnų, kuriems nustatyti augliai atlikus skrodimą, skaičių. Rezultatus reikėtų vertinti atitinkamu statistiniu metodu. Gali būti naudojamas bet kuris pripažintas statistinis metodas.

## 3. ATASKAITA

### 3.1. BANDYMO ATASKAITA

Jei įmanoma, bandymo ataskaitoje turėtų būti pateikiama tokia informacija:

- rūšis, veislė, šaltinis, aplinkos sąlygos, pašaras,
- bandymo 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 temperatūros, drėgmės ir, jei reikia, aerozolių koncentracijų arba dalelių dydžio stabilumo matavimo prietaisus.

Veikimo duomenys

Duomenys turėtų būti pateikiami lentelėse, nurodant vidurkius ir variacijos dydį (pvz., standartinį nukrypimą) ir pateikiant:

- a) oro srauto, pereinančio per inhaliacinę įrangą, greičius;
  - b) oro temperatūrą ir drėgmę;
  - c) nominalias koncentracijas (absoliutus įkvėpio įrangoje esančios bandomosios medžiagos kiekis, padalytas iš oro tūrio);
  - d) nešiklio, jei jis naudojamas, pobūdį;
  - e) faktines koncentracijas, esančias bandomoje kvėpuojamoje zonoje;
  - f) vidutinius dalelių dydžius (jei įmanoma nurodyti):
- dozių dydžiai (įskaitant nešiklį, jei toks buvo naudotas) ir koncentracijos vertės,

- auglių pasireiškimo duomenys pagal lytį, duotą dozę ir auglio tipą,
- nugaišimo laikas bandymo metu arba informacija, kad gyvūnai išgyveno iki numarinimo (įskaitant ir papildomos kontrolinės grupės gyvūnus),
- duomenys apie toksinį atsaką pagal tirtą lytį ir duotą dozę,
- toksinių ir kitų poveikių apibūdinimas,
- kiekvienos anomalijos pastebėjimo laikas ir tolesnė eiga,
- 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 šlapimo analizę) rezultatai,
- nekroskopijos metu gauti duomenys,
- visų histopatologinių tyrimų metu gautų duomenų išsamus 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.34. TOKSIŠKUMO VIENOS KARTOS DAUGINIMUISI BANDYMAS

## 1. METODAS

## 1.1. ĮVADAS

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

## 1.2. APIBRĖŽTYS

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

## 1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Nėra.

## 1.4. BANDYMO METODO PRINCIPAS

Bandomoji medžiaga duodama laipsniškais dozėmis kelioms eksperimentinių patinų ir patelių grupėms. Patinams dozės turėtų būti duodamos augimo metu bent vieną spermatogenezės ciklą (maždaug 56 dienas pelių patinams ir 70 dienų – žiurkių patinams) tam, kad būtų galima įvertinti visus neigiamus bandomosios medžiagos poveikius spermatogenezei.

Tėvinės (P) kartos patelėms dozė turi būti duodama bent dviejų rųjų laikotarpi, kad būtų galima įvertinti visus neigiamus bandomosios medžiagos poveikius kiaušinėlių subrendimo atžvilgiu. Tada gyvūnai suporuojami. Bandomoji medžiaga duodama abejoms lytims poravimosi metu ir vėliau duodama tik patelėms, iš pradžių gestacijos, o vėliau laktacijos laikotarpiu. Jei medžiaga duodama per kvėpavimo takus, metodą reikia atitinkamai pakoreguoti.

## 1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

Nėra.

## 1.6. BANDYMO METODO APIBŪDINIMAS

## 1.6.1. Pasiruošimas

Prieš pradėdant bandymą sveiki jauni gyvūnai atsitiktinės atrankos būdu atrenkami ir suskirstomi į bandomąją bei kontrolinę grupes. Mažiausiai penkias dienas prieš bandymą gyvūnai yra pratinami prie laboratorinių sąlygų. Rekomenduojama bandomąją medžiagą duoti kartu su pašaru ar geriamuoju vandeniu. Galimi ir kiti davimo būdai. Visiems gyvūnams bandomosios medžiagos dozė turėtų būti duodama tuo pačiu būdu visą atitinkamo eksperimento laikotarpį. Jei dozavimui palengvinti naudojamas nešiklis ar kiti priedai, jie turėtų nedaryti jokio toksinio poveikio. Dozė turėtų būti duodama septynis kartus per savaitę.

## 1.6.2. Eksperimentiniai gyvūnai

*Rūšių parinkimas*

Tinkamiausios gyvūnų rūšys yra pelės arba žiurkės. Reikėtų naudoti sveikus dar bandymams nenaudotus gyvūnus. Mažo vaisingumo veislės nenaudotinos. Apibūdinama bandomųjų gyvūnų rūšis, veislė, lytis, svoris ir (arba) amžius.

Norint tinkamai įvertinti vaisingumą, reikėtų tirti tiek patinus, tiek ir pateles. Prieš pradėdant duoti dozę, visi bandomieji bei kontroliniai gyvūnai turėtų būti atjunkyti.

*Skaičius ir lytis*

Kiekvienoje bandomojoje ir kontrolinėje grupėje turėtų būti pakankamas gyvūnų skaičius, kad būtų gaunama apie 20 vaikingų patelių, kurioms artėja arba atėjo atsivedimo laikas.

Taip siekiant užtikrinti pakankamą vaikingų patelių ir priauglio skaičių, kad būtų galima prasmingai įvertinti galimą bandomosios medžiagos poveikį vaisingumui, gestacijai ir tėvinės kartos P patelių elgesiui, taip pat pirmosios kartos F<sub>1</sub> palikuonių laktacijai, augimui bei vystymuisi nuo apvaisinimo iki subrendimo.

### 1.6.3. Bandymo sąlygos

Pašaras ir vanduo turėtų būti duodami *ad libitum*. Artėjant atsivedimo laikui, vaingos patelės turėtų būti atskiriamos, perkelti jas į atsivedimo ar atsivedusių patelių narvelius, kuriuose gali būti būtiniausių medžiagų gūžtai įsirengti.

#### 1.6.3.1. Dozė

Turėtų būti naudojamos mažiausiai trys bandomosios bei viena kontrolinė grupės. Jei bandomoji medžiaga duodama naudojant nešiklį, kontrolinei grupei turi būti duodamas didžiausias nešiklio tūris. Jei bandomoji medžiaga mažina pašaro pasisavinimą ar sunaudojimą, gali reikėti gretutinės maitinamos kontrolinės grupės. Jei nėra apribojimų dėl bandomosios medžiagos fizikinių ir cheminių savybių ar biologinio poveikio, geriausia, kad didžiausia dozė tėvinės kartos (P) gyvūnams sukeltų toksinį poveikį, bet ne gaishtamumą. Tarpinė(s) bandomosios medžiagos dozė(s) turėtų sukelti minimalų bandomajai medžiagai priskiriamą toksinį poveikį, o mažiausia dozė neturėtų sukelti jokio pastebimo neigiamo poveikio tėvams ar palikuonims. Jei medžiagos dozė duodama per zondą arba su kapsule, ji apskaičiuojama pagal kiekvieno gyvūno kūno masę ir patikslinama kiekvieną savaitę priklausomai nuo kūno masės pokyčių. Norint galima vaikingoms patelėms skirtas dozes apskaičiuoti pagal kūno masės duomenis 0 arba 6 gestacijos dieną.

#### 1.6.3.2. Ribinis bandymas

Mažai toksiškų medžiagų atveju, jei davus 1000 mg/kilogramui dozė negaunama įrodymų, kad bandomoji medžiaga slopina dauginimąsi, bandymų su kitomis dozėmis galima nebedaryti. Jei atlikus išankstinį bandymą, kurio metu naudota didelė medžiagos dozė, sukelti aiškų toksinį poveikį atsivedusiai patelei, nenustatomas joks neigiamas poveikis vaisingumui, bandymų su kitomis dozėmis galima nebedaryti.

#### 1.6.3.3. Bandymo atlikimas

##### Ekspertimentų tvarkaraščiai

Kasdieninis dozės davimas tėvinės (P) kartos patinams turėtų prasidėti tada, kai jie sulaukia 5–9 savaičių amžiaus, buvo atjunkyti ir mažiausiai penkias dienas aklimatizavosi. Žiurkėms dozė duodama 10 savaičių prieš jas suporuojant (pelėms aštuonias savaites). Patinus galima numarinti ir ištirti pasibaigus poravimosi laikotarpiui arba palikti ir toliau šerti pašaru su bandomąja medžiaga, kad jie galbūt antrą kartą apvaisintų pateles, ir juos numarinti po to prieš bandymo pabaigą. Tėvinės (P) kartos patelėms dozė turėtų būti pradėta duoti iškart po penkias dienas trukusios aklimatizacijos ir tęstis mažiausiai dvi savaites iki poravimosi periodo pradžios. Šioms patelėms dozė turėtų būti duodama kasdien maždaug tris savaites trunkančio poravimosi laikotarpio metu ir gestacijos laikotarpio metu iki F<sub>1</sub> kartos palikuonių atjunkymo. Jei yra kitų duomenų apie bandomąją medžiagą (pvz., bandomosios medžiagos sukeliamas metabolizmas arba bioakumuliacija), reikėtų apsvarstyti, ar nevertėtų pakeisti dozės davimo tvarkaraštį.

##### Poravimosi procedūra

Tiriant toksiškumą dauginimuisi, poruojama arba santykiu 1:1 (vienas patinas su viena patele) arba santykiu 1:2 (vienas patinas su dviem patelėmis).

Poruojant santykiu 1:1, viena patelė laikoma kartu su vienu patinu tol, kol prasideda gestacija arba praeina trys savaitės. Kiekvieną rytą patelės turėtų būti apžiūrimos siekiant nustatyti, ar yra spermos arba ar susidarė makšties kamštis. Nulinė gestacijos diena yra ta, kai randama sperma arba susidaręs makšties kamštis.

Tos poros, kurioms nepasiseka susiporuoti, turėtų būti ištiriamos siekiant nustatyti nevaisingumo priežastį.

Todėl galima imtis tokių papildomų procedūrų kaip poravimo su kitais tikrai vaisingais patiniais ar vaisingomis patelėmis, mikroskopiskai analizuojant dauginimosi organus ir tiriant kiaušinėlio ir spermatozoidų susiformavimo ciklą.

##### Vados dydžiai

Gyvūnams, kuriems vaisingumo bandymo metu duodama dozė, leidžiama normaliai atsivesti palikuonių ir auginti juos iki atjunkymo, nestandartizuojant vados dydžio.

Kai atliekamas vados dydžio standartizavimas, siūloma atlikti tokią procedūrą. Praėjus 1–4 dienoms po atsivedimo, kiekvienos vados dydis gali būti reguliuojamas pašalinant perteklinį prieauglį atrankos būdu taip, kad kiekvienoje vadoje liktų keturi patinėliai ir keturios patelės.

Jei neįmanoma vienoje vadoje turėti po keturis kiekvienos lyties palikuonis, tai priimtinas dalinis palikuonių skaičiaus reguliavimas (pvz., penki patinėliai ir trys patelės). Tų vadų, kuriuose yra mažiau nei aštuoni palikuonys, skaičius nėra reguliuojamas.

#### 1.6.4. Stebėjimai

Bandymo metu kiekvienas gyvūnas turėtų būti stebimas kasdien. Reikėtų registruoti atitinkamus elgesio pokyčius, komplikuoto arba užsitęsusio gestacijos požymius ir visus toksiškumo požymius, įskaitant gaištumą. Prieš poravimosi periodą ir jo metu galima kasdien įvertinti pašaro sunaudojimą. Po atsivedimo ir laktacijos laikotarpiu pašaro sunaudojimą (ir geriamo vandens sunaudojimą, jei bandomoji medžiaga duodama su vandeniu) reikėtų įvertinti tą pačią dieną, kurią sveriamą vada. Pirmąją dozės davimo dieną ir vėliau kas savaitę reikėtų sverti tėvinės (P) kartos patinus ir patelės. Šie kiekvieno gyvūno duomenys registruojami atskirai.

Gestacijos trukmė turėtų būti pradeda skaičiuoti nuo nulinės dienos. Kiekviena vada turi būti apžiūreta kaip galima greičiau po atsivedimo siekiant nustatyti jauniklių lytį, gimusių negyvų ir gimusių gyvų jauniklių skaičių ir dideles anomalijas.

Negyvi ir ketvirtą dieną po gimimo numarinti jaunikliai turėtų būti išsaugoti ir ištirti siekiant nustatyti galimus sutrikimus. Gimę gyvi jaunikliai turėtų būti suskaičiuojami ir vados pasvertos atsivedimo rytą, po to ketvirtą bei septintą dieną ir toliau kas savaitę iki baigsis bandymas, kuomet kiekvienas gyvūnas bus pasvertas atskirai.

Reikėtų registruoti patelių ar jų palikuonių fizinius ar elgesio sutrikimus.

#### 1.6.5. Patologija

##### 1.6.5.1. Nekroskopija

Tėvinės kartos (P) gyvūnams nugaišus bandymo metu ar juos numarinus, juos reikėtų makroskopiškai ištirti siekiant nustatyti visas struktūrines anomalijas ar patologinius pakitimus, kreipiant ypatingą dėmesį į dauginimosi organus. Nugaišę ar gaištantys jaunikliai turėtų būti ištirti siekiant nustatyti defektus.

##### 1.6.5.2. Histopatologinis tyrimas

Mikroskopiniam tyrimui reikėtų išsaugoti tėvinės kartos (P) gyvūnų kiaušides, gimdą, gimdos kaklelį, makštį, sėklides, antseklidį, spermą gaminančius maišelius, prostatą, koaguliacijos liauką, hipofizę bei bandomąją medžiaga paveiktus organus. Jei šie organai nebuvo tirti atliekant kitus bandymus su daug skirtingų dozių, juos reikėtų mikroskopiškai ištirti didelę dozę gavusiems gyvūnams, kontrolinės grupės gyvūnams bei bandymo metu nugaišusiems gyvūnams, jei tai praktiškai įmanoma.

Tie šių gyvūnų organai, kuriuose nustatytos anomalijos, turėtų būti ištirti visiems likusiems tėvinės kartos (P) gyvūnams. Tokiu atveju reikėtų mikroskopiškai tirti visus audinius, kuriuose pastebėti pagrindiniai patologiniai pokyčiai. Kaip buvo pasiūlyta aprašant suporavimo procedūrą, tų gyvūnų, kurie, kaip įtariama, gali būti nevaisingi, dauginimosi organai gali būti mikroskopiškai tiriami.

## 2. DUOMENYS

Duomenys gali būti apibendrinami lentelėse, kuriose nurodomas kiekvienos bandomosios grupės gyvūnų skaičius bandymo pradžioje, vaisingų patinų skaičius, vaikingų patelių skaičius, pokyčių tipai ir gyvūnų, kuriuose pasireiškė kiekvieno tipo pokyčiai, skaičius, išreikštas procentais.

Jei įmanoma, skaičiais išreikšti rezultatai turėtų būti apdorojami tinkamu statistiniu metodu. Galima taikyti bet kurį visuotinai pripažintą statistinį metodą.



### 3. ATASKAITA

#### 3.1. BANDYMO ATASKAITA

Jei įmanoma, bandymo ataskaitoje turėtų būti pateikiama tokia informacija:

- panaudota rūšis/veislė,
- duomenys apie toksinį atsaką pagal lytį ir duotą dozę, įskaitant vaisingumą, gestaciją ir gyvybingumą,
- nugaišimo laikas bandymo metu arba informacija, kad gyvūnai išgyveno iki bandymo pabaigos,
- lentelė, kurioje pateikiama kiekvienos vados masė, vidutinis jauniklių svoris ir kiekvieno jauniklio kūno masė bandymo pabaigoje,
- toksinis ir kitoks poveikis dauginimuisi, palikuonims bei jų vystymuisi,
- kiekvienos anomalijos pastebėjimo laikas ir tolesnė eiga,
- tėvinės kartos (P) gyvūnų svoris,
- nekroskopijos metu gauti duomenys,
- mikroskopinių tyrimų duomenų išsamus apibūdinimas,
- rezultatų statistinė analizė, jei įmanoma tai padaryti,
- rezultatų aptarimas,
- rezultatų aiškinimas.

#### 3.2. ĮVERTINIMAS IR AIŠKINIMAS

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

### 4. NUORODOS

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

**B.35. TOKSIŠKUMO DVIEJŲ KARTŲ DAUGINIMUISI BANDYMAS****1. METODAS**

Šis metodas atitinka OECD TG 416 (2001).

**1.1. ĮVADAS**

Šis dviejų kartų dauginimosi bandymo metodas skirtas suteikti bendros informacijos apie bandomosios medžiagos poveikį patinų ir patelių dauginimosi sistemų vientisumui ir veiksmingumui, įskaitant lytinių liaukų funkciją, rujos ciklą, poravimosi elgesį, apvaisinimą, gestaciją, atsivedimą, laktaciją, atjunkymą ir palikuonių augimą bei vystymąsi. Be to, atliekant bandymą galima gauti informacijos apie bandomosios medžiagos poveikį ką tik atsivestų jauniklių liguistumui, gaištamumui, preliminarių duomenų apie toksinį poveikį prenataliniam ir postnataliniam vystymuisi, taigi juo galima remtis atliekant vėlesnius bandymus. Taikant šį metodą tiriamas ne tik F1 kartos augimas ir vystymasis, jis taip pat skirtas patinų ir patelių dauginimosi sistemų vientisumui bei veiksmingumui ir F2 kartos augimui bei vystymuisi įvertinti. Norint gauti papildomos informacijos apie toksinį poveikį vystymuisi ir funkcinis trūkumus, šį protokolą galima papildyti kitų bandymų segmentais, atsižvelgiant į atitinkamus toksiško vystymuisi ir (arba) neurotoksiškumo vystymuisi metodus, arba šie parametrai galėtų būti tiriami atliekant atskirus bandymus taikant atitinkamus bandymų metodus.

**1.2. BANDYMO METODO PRINCIPAS**

Kelioms patinų ir patelių grupėms duodamos skirtingos bandomosios medžiagos dozės. P kartos patinai turėtų gauti dozę augdami ir mažiausiai vieną visą spermatogenezės ciklą (maždaug 56 paras pelėms ir 70 parų žiurkėms), kad būtų galima gauti informacijos apie neigiamą poveikį spermatogenezei. Poveikis spermai nustatomas pagal kelis spermos parametrus (pvz., spermos morfologiją ir spermatozoidų judrumą), audinių preparatuose ir darant išsamų histopatologinį tyrimą. Jei duomenų apie spermatogenezę gauta ankstesniame pakankamos trukmės kartotinės dozės bandyme, pvz., 90 parų bandyme, P kartos patinų nebūtina įtraukti į vertinimą. Tačiau rekomenduojama išsaugoti P kartos spermos ėminių arba skaitmeninių užrašus, kad juos vėliau galima būtų įvertinti. P kartos patelės turi gauti dozę augdamos ir kelis visus rujos ciklus, kad būtų galima nustatyti bet kokią neigiamą bandomosios medžiagos poveikį normaliam rujos ciklui. Bandomoji medžiaga duodama tėvų kartos (P) gyvūnams poruojantis, gestacijos metu ir iki jų F1 palikuonių atjunkymo. Po atjunkymo medžiaga toliau duodama F1 palikuonims iki jų subrendimo, poravimosi ir, atsiradus F2 kartai, iki šios kartos palikuonių atjunkymo.

Visi gyvūnai stebimi kliniškai ir atliekami pataloginiai tyrimai toksiško požymiams nustatyti, kreipiant ypač didelį dėmesį į poveikį patinų ir patelių dauginimosi sistemų vientisumui ir veiksmingumui bei palikuonių augimui ir vystymuisi.

**1.3. BANDYMO METODO APRAŠYMAS****1.3.1. Gyvūnų rūšies pasirinkimas**

Tinkamiausia bandomųjų gyvūnų rūšis yra žiurkės. Jei naudojama kita rūšis, pasirinkimas turi būti pagrįstas ir padaromi atitinkami reikalingi pakeitimai. Neturi būti naudojamos mažo vaisingumo veislės arba veislės, kurioms dažnai pasireiškia vystymosi trūkumai. Bandymo pradžioje naudojamų gyvūnų masės skirtumai turi būti kiek įmanoma mažesni ir nukrypti ne daugiau kaip 20 % nuo kiekvienos lyties atitinkamos vidutinės masės.

**1.3.2. Laikymo ir šėrimo sąlygos**

Bandomųjų gyvūnų patalpos temperatūra turi būti 22 °C (± 3 °C). Nors santykinė oro drėgmė turėtų būti mažiausiai 30 % ir pageidautina ne didesnė kaip 70 %, išskyrus patalpos plovimo laiką, reikėtų siekti, kad būtų 50–60 % drėgmė. Apšvietimas turi būti dirbtinis, jo seka: 12 h šviesos ir 12 h tamsos. Gyvūnams šerti tinka įprastas laboratorijoje naudojamas pašaras, neribojant geriamo vandens kiekio. Pašaro pasirinkimui gali turėti įtakos būtinybė tinkamai įmaišyti bandomąją medžiagą, duodant ją šiuo būdu.

Gyvūnai gali būti laikomi narveliuose atskirai arba mažomis tos pačios lyties gyvūnų grupėmis. Poruojama turi būti šiam tikslui pritaikytuose narveliuose. Pasitvirtinus susiporavimui, suporuotos patelės turi būti laikomos po vieną atsivedimo arba veisimo narveliuose. Suporuotos žiurkės taip pat gali būti laikomos mažomis grupėmis ir atskiriamos likus vienai arba dviem paroms iki atsivedimo. Artėjant atsivedimui, suporuotos patelės turi būti ap rūpinamos tinkamomis ir nustatytomis gužtos sukimo medžiagomis.

### 1.3.3. Gyvūnų ruošimas

Naudojami jauni ir sveiki, ankstesniuose bandymuose nedalyvavę gyvūnai, kurie mažiausiai 5 paras yra pratinami prie laboratorijos sąlygų. Apibūdinama bandomojo gyvūno rūšis, veislė, šaltinis, lytis, masė ir (arba) amžius. Turi būti žinoma visų gyvūnų tarpusavio giminystė, kad būtų išvengta vienu tėvų gyvūnų poravimosi. Gyvūnai atsitiktinai suskirstomi į kontrolinę ir bandymo grupę (rekomenduojama grupuoti pagal kūno masę). Narveliai išdėstomi taip, kad būtų kiek įmanoma sumažintas bet koks galimas poveikis dėl narvelio buvimo vietos. Kiekvienam gyvūnui turėtų būti priskirtas savitas identifikavimo numeris. P kartos gyvūnams tai daroma prieš pradėdant duoti bandomąją medžiagą. F1 kartos gyvūnams tai daroma atjunkant poravimui pasirinktus gyvūnus. Duomenys apie visų pasirinktų F1 gyvūnų kilmės vadą turi būti registruojami. Be to, rekomenduojama kiek manoma anksčiau atskirai identifikuoti žiurkiukus, kai numatoma atskirai juos sverti arba daryti kokius nors funkcinius bandymus.

Pradėjus duoti dozes tėvų kartos (P) gyvūnams jie turi būti maždaug 5–9 savaičių. Visų bandomųjų grupių gyvūnai turi būti kiek įmanoma vienodos masės ir amžiaus.

## 1.4. BANDYMO EIGA

### 1.4.1. Gyvūnų skaičius ir lytis

Kiekvienoje bandymo ir kontrolinėje grupėje turi būti pakankamas patelių skaičius, kad atsivedimo momentu arba jam artėjant būtų ne mažiau kaip 20 vaikingų patelių. Tai gali būti neįmanoma bandant medžiagas, sukeliančias nepageidaujamą su bandomąja medžiaga siejamą poveikį (pvz., nevaisingumą, per didelį toksiškumą esant didelei dozei). Tikslas – gauti pakankamą atsivedančių patelių skaičių, kad būtų galima prasmingai įvertinti, kokia yra bandomosios medžiagos geba paveikti vaisingumą, gestaciją, motinos elgesį, laktaciją, F1 palikuonio augimą ir vystymąsi nuo apvaisinimo iki subrendimo ir jo palikuonių (F2) vystymąsi iki atjunkimo. Todėl nepavykus gauti norimą vaikingų patelių skaičių (t. y. 20), bandymas nebūtinai bus netinkamas ir turi būti vertinamas atsižvelgiant į kiekvieną atskirą atvejį.

### 1.4.2. Dozių ruošimas

Rekomenduojama bandomąją medžiagą duoti per virškinamąjį traktą (su pašaru, geriamuoju vandeniu arba per zondą), išskyrus kai manoma, kad tinkamesnis būtų kitas davimo būdas (pvz., per odą arba per kvėpavimo takus).

Pririekus bandomoji medžiaga ištirpinama arba suspenduojama tinkamame nešiklyje. Rekomenduojama visais įmanomais atvejais iš pradžių tirti galimybę naudoti vandeninį tirpalą ar suspensiją, vėliau tirpalą ar emulsiją aliejuje (pvz., kukurūzų aliejuje) ir tik tuomet galimybę tirpinti kitame nešiklyje. Turi būti žinomos nešiklio, išskyrus vandenį, toksinės savybės. Turėtų būti nustatytas bandomosios medžiagos stabilumas nešiklyje.

### 1.4.3. Dozavimas

Turi būti naudojamos mažiausiai trijų dozių grupės ir lygiagrečiai viena kontrolinė grupė. Jei nėra apribojimų dėl fizikinių ir cheminių arba biologinių bandomosios medžiagos savybių, didžiausia dozė pasirenkama siekiant sukelti tam tikrą toksinį poveikį, bet ne žūtį arba sunkias kančias. Nenumatyto gaištamumo atveju bandymai, kuriuose tėvų kartos (P) gyvūnų gaištamumas yra mažesnis kaip maždaug 10 %, paprastai yra dar priimtini. Turi būti pasirinkta mažėjanti dozės koncentracijos seka, siekiant gauti kiekvieną su dozės dydžiu susietą reakciją ir nepastebėto neigiamo poveikio ribą (NOAEL). Mažėjančioms dozės koncentracijos vertėms nustatyti dažnai pakanka dvigubo arba keturgubo koncentracijos skirtumo ir dažnai geriau būtų papildomai naudoti ketvirtą bandymo grupę, užuot naudojus labai didelius intervalus tarp dozių (pvz., daugiklis didesnis kaip 10). Bandomąją medžiagą dedant į pašarus dozės neturėtų skirtis daugiau kaip 3 kartus. Dozės dydis turėtų būti pasirenkamas atsižvelgiant į visus turimus toksiškumo duomenis, ypač kartotinių dozių bandymo rezultatus. Be to, reikėtų nagrinėti visą papildomą informaciją apie bandomojo junginio arba giminingų medžiagų apykaitą ir kinetiką. Kartu ši informacija padėtų sužinoti, ar dozavimo režimo yra tinkamas.

Kontrolinė grupė turėtų būti medžiagos negaunanti grupė arba nešiklį gaunanti kontrolinė grupė, jei bandomajai medžiagai duoti naudojamas nešiklis. Išskyrus tai, kad kontrolinės grupės gyvūnai neveikiami bandomąja medžiaga, jie prižiūrimi tokiu pat būdu, kaip ir bandymo grupės gyvūnai. Jei naudojamas nešiklis, kontrolinės grupės turėtų gauti nešiklio kiekį, atitinkanti didžiausią naudojamą nešiklio tūrį. Jei bandomoji medžiaga duodama su pašaru ir dėl to sumažėja pašaro suvartojimas arba įsisavinimas, gali tekti naudoti lygiagrečiai šeriamą kontrolinę grupę. Vietoj lygiagrečiai šeriamos kontrolinės grupės galima naudoti duomenis, gautus kontroliuojamuose bandymuose, skirtuose įvertinti sumažėjusio pašaro suvartojimo įtaką dauginimosi parametrams.

Reikėtų atsižvelgti į šias nešiklio ir kitų priedų savybes: poveikį absorbcijai, pasiskirstymui, medžiagų apykaitai ir bandomosios medžiagos sulaukymui; poveikį bandomosios medžiagos cheminėms savybėms, dėl kurių gali pasikeisti jos toksiškumas; poveikį maisto ar vandens suvartojimui arba gyvūnų įmitimui.

#### 1.4.4. Ribinis bandymas

Jei darant bandymą pagal šiame bandyme aprašytas metodikas su viena mažiausiai 1 000 mg/kg kūno masės per parą doze, kuri yra duodama per virškinamąjį traktą, arba su atitinkamos procentinės dalies doze, dedama į pašarą arba į geriamą vandenį, toksinis poveikis tėvų grupių gyvūnams arba jų palikuonims nepastebimas ir jei toks poveikis nenumatomas atsižvelgiant į turimus duomenis apie giminingos struktūros ir (arba) apykaitos junginius, nebūtina daryti visą bandymą, naudojant kelias dozių koncentracijas. Toks ribinis bandymas netaikomas tais atvejais, kai atsižvelgiant į žmonių sąlytį su medžiaga reikia naudoti didesnio dydžio per virškinamąjį traktą duodamas dozes. Kalbant apie kitus davimo būdus, pvz., per kvėpavimo takus arba per odą, bandomosios medžiagos fizikinės ir cheminės savybės dažnai gali lemti ir riboti didžiausią pasiekiamą veikimo lygį.

#### 1.4.5. Dozių davimas

Gyvūnai gauna bandomosios medžiagos dozę septynias dienas per savaitę. Geriau duoti per virškinamąjį traktą (su pašaru, geriamuoju vandeniu arba naudojant zondą). Jei duodama kitu būdu, jis turi būti pagrįstas, be to, gali tekti daryti atitinkamus pakeitimus. Atitinkamu bandymo laikotarpiu visi gyvūnai turi gauti dozę vienodu būdu. Kai bandomoji medžiaga duodama per zondą, reikia naudoti skrandžio vamzdelį. Vienu metu duodamo skysčio tūris neturi būti didesnis kaip 1 ml/100 g kūno masės (0,4 ml/100 g kūno masės yra didžiausias kiekis naudojant kukurūzų aliejų), išskyrus vandeninius tirpalus, kurių galima duoti po 2 ml/100 g kūno masės. Išskyrus dirginančias arba 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 bandymus su zonda, jaunikliai dažniausiai gauna bandomosios medžiagos netiesiogiai su pienu tol, kol atjunkyti patys pradeda gauti dozes. Jei bandymai daromi medžiagą dedant į pašarą arba geriamąjį vandenį, jaunikliai papildomai gauna bandomosios medžiagos tiesiogiai, kai paskutinę laktacijos laikotarpio savaitę jie pradeda esti patys.

Jei medžiagos duodamos su pašaru arba geriamuoju vandeniu, svarbu užtikrinti, kad naudojami bandomosios medžiagos kiekiai netrukdytų įprastai mitybai arba vandens pusiausvyrai. Kai bandomoji medžiaga duodama su pašaru, galima naudoti nuolatinę koncentraciją (ppm) arba nuolatinę dozę pagal gyvūno kūno masę; naudotas variantas turi būti nurodytas. Jei medžiaga duodama per zondą, dozė turėtų būti duodama kiekvieną dieną panašiu laiku ir reguliuojama mažiausiai kartą per savaitę, kad būtų užtikrintas stabilus dozės ir gyvūno kūno masės santykis. Reikėtų atsižvelgti į informaciją dėl placentinio pasiskirstymo, reguliuojant per zondą duodamą dozę, nustatomą pagal gyvūno masę.

#### 1.4.6. Eksperimento tvarkaraštis

Kasdieninės dozės tėvų kartos (P) patinams ir patelėms pradedamos duoti, kai jie sulaukia 5–9 savaičių. Kasdieninės F1 patinų ir patelių dozės pradedamos duoti po atjunkymo; reikėtų turėti omenyje, kad tais atvejais, kai bandomoji medžiaga duodama su pašaru arba geriamuoju vandeniu, tiesioginis F1 kartos jauniklių veikimas bandomąja medžiaga gali vykti laktacijos laikotarpiu. Abiem lytims (P ir F1) dozės turi būti toliau duodamos mažiausiai 10 savaičių prieš poravimosi laikotarpį. Dozės toliau duodamos abiem lytims 2 savaites poravimosi laikotarpiu. Kai patinai nebereikalingi medžiagos poveikio dauginimuisi įvertinimo aspektu, jie turi būti humaniškai numarinami ir ištiriami. Tėvų kartos (P) patelėms dozės duodamos toliau visą gestacijos laiką ir iki F1 palikuonių atjunkymo. Reikėtų atsižvelgti į dozavimo programos pakeitimus, pagrįstus turima informacija apie bandomąją medžiagą, įskaitant turimus toksiškumo, medžiagų apykaitos indukcijos arba biologinio kaupimosi duomenis. Kiekvieno gyvūno dozė paprastai turėtų būti pagrįsta pačiu paskutiniu atskiro gyvūno masės nustatymu. Tačiau reikia imtis atsargumo priemonių reguliuojant dozės dydį paskutinį gestacijos trimestrą.

P ir F1 kartų patinų ir patelių veikimas medžiaga tęsiamas iki jų numarinimo. Visi P ir F1 suaugę patinai ir patelės turi būti humaniškai numarinami, kai jų nebereikia poveikiui dauginimuisi įvertinti. Visi poravimui nepasirinkti F1 palikuonys ir visi F2 palikuonys po atjunkymo turi būti humaniškai numarinami.

#### 1.4.7. Poravimo eiga

##### 1.4.7.1. Tėvų kartos (P) poravimas

Kiekvienam suporavimui patelė atskirai uždaroma į narvelį su vienu tą pačią dozę gaunančiu patinu (1:1 poravimas) tol, kol jie susiporuoja, arba 2 savaitėms. Kiekvieną dieną patelės apžiūrimos, ar yra spermos arba ar susidarė makšties kamštis. 0 gestacijos diena laikoma ta diena, kai randama spermos arba makšties kamštis.

Jei poravimasis nesėkmingas, galima apsvarstyti galimybę pakartotinai suporuoti patelę su patikrintais tos pačios grupės reproduktoriais. Susiporavę gyvūnai aiškiai nurodomi bandymo duomenyse. Reikėtų vengti vienu tėvų palikuonių poravimo.

#### 1.4.7.2. F1 kartos poravimas

Norint poruoti F1 kartos palikuonis F2 kartai gauti, atjunkymo metu iš kiekvienos vados pasirenkamas mažiausiai vienas patinas ir viena patelė poravimui su kitais tą pačią dozę gavusiais kitos vados jaunikliais. Kiekvienos vados jauniklių pasirinkimas turi būti atsitiktinis, jei vienoje vadoje nėra reikšmingų kūno masės arba išvaizdos skirtumų. Tais atvejais, kai skirtumų yra, pasirenkami geriausi kiekvienos vados atstovai. Praktiškai tai geriausiai būtų daryti pagal kūno masę, bet gali labiau tikti atranka pagal išvaizdą. F1 palikuonys poruojami tik pasiekę lytinę brandą.

Turėtų būti įvertintos poros be palikuonių, siekiant nustatyti aiškiai nevaisingumo priežastį. Galima imtis papildomo poravimo su kitais patikrintais patiniais arba patelėmis, atlikti dauginimosi organų mikroskopinį tyrimą ir rujos ciklą arba spermatogenezės tyrimą.

#### 1.4.7.3. Antrasis poravimas

Tam tikrais atvejais, pvz., kai dėl veikimo medžiaga pakinta vados dydis arba pastebimas neaiškus poveikis per pirmąjį poravimą, rekomenduojama P arba F1 kartų suaugusius gyvūnus dar kartą poruoti naujai vadai gauti. Rekomenduojama dar kartą poruoti vados neturėjusias pateles arba patinus su patikrintais priešingos lyties reproduktoriais. Jei laikoma, kad yra būtina bet kurios kartos antroji vada, gyvūnai turėtų būti poruojami praėjus savaitei nuo paskutinės vados atjunkymo.

#### 1.4.7.4. Vados dydis

Gyvūnams leidžiama normaliai atsivesti vadą ir auginti palikuonis iki atjunkymo. Standartizuoti vados dydį neprivaloma. Standartizavus vados dydį, išsamiai aprašomas taikytas metodas.

### 1.5. STEBĖJIMAI

#### 1.5.1. Klinikiniai stebėjimai

Bendrasis klinikinis stebėjimas atliekamas kas dieną, ir jei medžiaga duodama per zondą, stebėjimo laiką reikėtų nustatyti atsižvelgiant į didžiausio laukiamo poveikio po medžiagos davimo laiką. Turi būti užrašomi visi elgesio pokyčiai, sunkaus arba ilgnesnio atsivedimo požymiai ir visi toksiškumo požymiai. Mažiausiai kas savaitę turėtų būti atliekamas papildomas išsamesnis kiekvieno gyvūno tyrimas, kurį patogiu daryti gyvūną sveriant. Du kartus per dieną ir prireikus kartą per dieną savaitgaliais visi gyvūnai turi būti stebimi siekiant nustatyti liguistumo požymius ir nugaišusius gyvūnus.

#### 1.5.2. Tėvų kartos gyvūnų kūno masė ir pašaro ar vandens suvartojimas

Tėvų kartų (P ir F1) gyvūnai sveriami pirmąją dozės davimo dieną ir vėliau mažiausiai kartą per savaitę. Tėvų kartos (P ir F1) patelės sveriamos ne mažiau kaip 0, 7, 14, ir 20 arba 21 gestacijos dieną, laktacijos metu sveriamos tomis pačiomis dienomis, kaip ir vada, ir gyvūnų numaravimo dieną. Šie rezultatai turi būti pateikiami atskirai apie kiekvieną suaugusį gyvūną. Poravimo ir gestacijos laikotarpiu pašaro suvartojimas turi būti matuojamas mažiausiai kas savaitę. Vandens suvartojimas matuojamas mažiausiai kas savaitę, jei bandomoji medžiaga duodama su vandeniu.

#### 1.5.3. Rujos ciklas

P ir F1 kartų patelių rujos ciklo trukmė ir normalumas įvertinamas prieš suporavimą ir, nebūtinai, poravimo metu darant makšties tepinėlius tol, kol bus gautas suporavimo įrodymas. Makšties ar gimdos kaklelio ląstelės turi būti imamos atsargiai, kad nebūtų pažeista gleivinė ir tokiu būdu nebūtų sukeltas netikras veisimas (1).

#### 1.5.4. Spermos parametrai

Numarinius P ir F1 patinus užrašoma jų sėklidžių ir antisėklidžių masė ir bent vienas kiekvieno organo pavyzdys paliekamas histopatologiniam tyrimui (žr. 1.5.7, 1.5.8.1 skirsnius). Iš kiekvienos P ir F1 patinų grupės bent 10 gyvūnų pogrupio sėklidės ir antisėklidžiai naudojami homogenizavimui atsparioms spermaticidams ir antisėklidžių uodegoje sukauptiems spermatozoidams suskaičiuoti. Turi būti surinkta to paties pogrupio patinų

sperma iš antsklidžių uodegos arba iš sėklinio latakų spermų judrumui ir morfologijai įvertinti. Jei pastebimas su bandomąja medžiaga susijęs poveikis arba jei yra per kitus bandymus gautų duomenų apie galimą poveikį spermatogenezei, turėtų būti tiriama visų kiekvienos dozės grupės patinų sperma; priešingu atveju galima apsiriboti kontrolinės grupės ir didžiausios dozės grupės P ir F1 patinų spermatozoidų skaičiavimu.

Skaičiuojamas bendras homogenizavimui atsparių sėklidžių spermatidžių ir antsklidžių uodegos spermatozoidų skaičius (2) (3). Spermų atsargas uodegoje galima apskaičiuoti pagal suspensijos, naudojamos kokybiniam įvertinimui, spermatozoidų koncentraciją ir tūrį, ir spermatozoidų, išgautų vėliau sumalant ir (arba) homogenizuojant likusią uodegos audinį, skaičių. Visų dozių patinų grupių pasirinktų pogrupių gyvūnų spermatozoidai skaičiuojami iškart po gyvūnų numaravimo, 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.

Antsklidžio (arba sėklinio latakų) spermatozoidų judrumas įvertinimas arba filmuojamas iš karto po numaravimo. Sperma turi būti išgauta, kiek įmanoma mažinant galimybę jai pakenkti ir skiedžiama judrumui analizuoti, taikant tinkamus metodus (4). Subjektyviai arba objektyviai įvertinama vis labiau judresnių spermatozoidų procentinė dalis. Kai daroma kompiuterinė judėjimo analizė (5) (6) (7) (8) (9) (10), didėjantis judrumas nustatomas pagal vartotojo nustatytas ribines vertes vidutiniam greičiui išilgai trajektorijos ir tiesiškumui arba tiesiškumo indeksui. Jei ėminiai filmuojami (11) arba nekroskopija įrašinėjama kitu būdu, vėliau galima analizuoti tik kontrolinę ir didelę dozę gavusių P ir F1 patinų grupes, išskyrus kai pastebimas su bandomąja medžiaga susijęs poveikis; šiuo atveju dar reikia įvertinti mažesnių dozių grupes. Neturint analoginio arba skaitmeninio vaizdo įrašo, visi visų apdorotų grupių ėminiai analizuojami darant skrodimą.

Daromas antsklidžio (arba sėklinio latakų) spermų ėminio morfologinis įvertinimas. Spermatozoidai (bent 200 vienam ėminui) ištiriami kaip fiksuoti preparatai bei skystoje terpėje (12) ir klasifikuojami kaip normalūs arba ne-normalūs. 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 numaravimo arba vėliau pagal analoginius arba skaitmeninius vaizdo įrašus. Fiksuotus tepinėlius galima analizuoti ir vėliau. Šiais atvejais kontrolinių ir didžiausios dozės grupės gali būti analizuojamos pirmos. Jei su bandomąja medžiaga susijusio poveikio (pvz., poveikio spermatozoidų morfologijai) nėra, kitų grupių analizuoti nebūtina. Jei didelę dozę gavusioje grupėje pastebimas su bandomąja medžiaga susijęs poveikis, reikia įvertinti ir mažesnių dozių grupes.

Jei kuris nors iš pirmiau išvardytų spermų įvertinimo parametrų jau buvo tiriamas darant bent 90 parų toksikumo sistemai bandymą, šio įvertinimo nebūtina kartoti darant dviejų kartų bandymą. Tačiau rekomenduojama pasilikti P kartos spermų ėminius arba skaitmeninius vaizdo įrašus, kad prireikus būtų galima įvertinti vėliau.

#### 1.5.5. Palikuonys

Kiekviena vada tiriama kiek įmanoma greičiau po atsivedimo (0 laktacijos para) norint nustatyti jauniklių skaičių ir lytį, negyvagimius, gyvus palikuonis ir tai, ar yra stambių anomalijų. Nulinę parą rasti negyvi žiurkiukai, jei jie nemaceruoti, tiriama 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.

Palikuonių fizinis vystymasis daugiausia registruojamas pagal kūno masės padidėjimą. Kiti fiziniai parametrai (pvz., ausų ir akių atsivėrimas, dantų prasikalimas, kailio augimas) gali suteikti papildomos informacijos, tačiau šiuos duomenis būtų geriau vertinti atsižvelgiant į lytinio brendimo duomenis (pvz., amžius ir kūno 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 atjunktų gyvūnų makšties atsidarymo ir apyvarpės atsiskyrimo laikas. Išmatuojamas F2 žiurkiukų anogenitalinis atstumas nulinę parą po gimimo, jei buvo nustatytas F1 lyčių santykio arba lytinio subrendimo laiko pakitimas.

Funkcinių stebėjimų galima nedaryti tose grupėse, kuriose yra aiškių neigiamo poveikio požymių (pvz., reikšmingas masės didėjimo sumažėjimas ir t. t.). Jei daromi funkciniai tyrimai, jie nedaromi poravimui atrinktiems žiurkiukams.

#### 1.5.6. **Bendroji nekroskopija**

Numarinti arba darant bandymą nugaišę visi tėvų kartos (P ir F1) gyvūnai, visi jaunikliai su išorinėmis anomalijomis arba klinikiniais požymiais, be to, atsitiktinai pasirinktas iš kiekvienos F1 ir F2 kartos kiekvienos vados kiekvienos lyties jauniklis tiriami makroskopiškai struktūros anomalijoms arba patologiniams pakitimams nustatyti. Ypatingas dėmesys kreipiamas į dauginimosi sistemos organus. Humaniškai numarinti leisgyviai jaunikliai ir nevyvi jaunikliai, jei nemaceruoti, tiriami galimiems defektams ir žūties priežastčiai nustatyti, vėliau užkonservuojami.

Tiriama visų pirmą kartą atsivedusių patelių gimda implantavimo vietų buvimui ir skaičiui nustatyti, stengiantis nepakenkti histopatologiniam įvertinimui.

#### 1.5.7. **Organų masė**

Numarinus nustatoma visų P ir F1 kartų tėvų kūno ir šių organų masė (poriniai organai sveriami atskirai):

- gimdos, kiaušidžių,
- sėklidės, antsėklidžio (viso ir uodegos),
- prostatos,
- sėklinių pūslelių su koaguliatorių liaukomis ir jų skysčiais ir prostatos (kaip vieno vieneto),
- smegenų, kepenų, inkstų, blužnies, hipofizės, skydliaukės, antinksčių liaukų ir žinomų veikiančių organų.

Po numaravimo nustatoma skrodimui pasirinktų F1 ir F2 jauniklių masė. Sveriami šie vieno atsitiktinai pasirinkto kiekvienos vados kiekvienos lyties jauniklio (žr. 1.5.6 skirsnį) organai: smegenys, blužnis ir užkrūčio liauka.

Bendroji nekroskopijos ir organų masės rezultatai įvertinami atsižvelgiant į stebėjimus kitų kartotinės dozės bandymų metu, jei įmanoma.

#### 1.5.8. **Histopatologiniai tyrimai**

##### 1.5.8.1. *Tėvai*

Histopatologiniam tyrimui fiksuojami ir atitinkamoje terpėje konservuojami šie tėvų (P ir F1) kartos gyvūnų organai ir audiniai arba jų tipiniai ėminiai:

- makštis, gimda ir kaklelis, kiaušidės (konservuojamos atitinkamoje fiksavimo priemonėje),
- viena sėklidė (konservuojama Bouin arba panašioje fiksavimo priemonėje), vienas antsėklidis, sėklinės pūslelės, prostata ir koagulianto liaukos,
- visų poravimui pasirinktų P ir F1 gyvūnų organas (-ai), ankstesniuose bandymuose identifikuotas (-i) kaip veikiamas (-i) organai.

Daromi išsamūs histopatologiniai visų poravimui pasirinktų P ir F1 gyvūnų, priklausančių kontrolinėms ir didelės dozės grupėms, užkonservuotų organų ir audinių tyrimai. P kartos gyvūnų kiaušidžių tyrimas neprivalomas. Dar tiriami mažos bei vidutinės dozės grupių organai, kuriems pasireiškia su bandomąja medžiaga siejami pakitimai, kad būtų lengviau nustatyti NOAEL. Be to, daromas histopatologinis mažos ir vidutinės dozės grupių gyvūnų, kuriems įtariamas sumažėjęs vaisingumas, pvz., kurie negalėjo susiporuoti, pastoti, būti reproduktoriumi arba atsivesti sveikus palikuonis, arba kurių rujos ciklas arba spermatozoidų skaičius, judrumas arba morfologija buvo paveikti, dauginimosi organų įvertinimas. Turi būti ištirti visi dideli pažeidimai, pvz., atrofija arba augliai.

Daromas išsamus sėklidžių histopatologinius tyrimas (pvz., naudojant Bouin fiksavimo skystį, į parafiną įlietus ėminius ir 4–5 μm storio skersinius pjūvius), siekiant nustatyti su bandomąja medžiaga susietą poveikį, pvz., spermatozoidų sulaikymą, gemalų ląstelių sluoksnių arba tipų trūkumą, daugiabranduoles didelės ląstelės arba spermatozoidų ląstelių atitrūkimą į prošvaisą (14). Nepažeisto antsėklidžio tyrimas, tiriant galvutę, kūną ir



uodegą, gali būti daromas įvertinant išilginių pjūvį. Antseklidis įvertinamas leukocitų infiltracijai, ląstelių vyraujančių tipų pokyčiui, netipiškoms ląstelėms ir spermatozoidų fagocitozei nustatyti. Patinų dauginimosi organų tyrimui gali būti naudojamas dažymas PAS (jodo perrūgštis ir Sifo reagentu) arba hematoksilinu.

Po laktacijos kiaušidėje turi būti pirminiai ir augantys folikulai ir dideli laktacijos geltonkūniai. Darant histopatologinį tyrimą turėtų būti nustatytas kokybinis pirminių folikulų 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).

#### 1.5.8.2. *Atjunkyti jaunikliai*

Histopatologiniam tyrimui fiksuojami ir tinkamoje terpėje laikomi visų jauniklių audiniai, kuriuose pastebima didelių anomalijų, ir paveikti organai, be to, fiksuojami ir laikomi histopatologiniam tyrimui po vieną atsitiktinai pasirinktą F1 ir F2 kartų kiekvienos vados kiekvienos lyties jauniklį, kuris nepasirinktas poravimui. Daromas išsamus histopatologinis konservuoto audinio apibūdinimas, ypatingą dėmesį kreipiant dauginimosi sistemai.

## 2. **DUOMENYS**

### 2.1. REZULTATŲ APDOROJIMAS

Duomenys pateikiami atskirai ir apibendrinami lentelėse, kuriose nurodomas kiekvienos bandymo grupės ir kiekvienos kartos gyvūnų skaičius bandymo pradžioje, darant bandymą nugaišusių arba dėl gyvūnų gerovės priežasčių numarintų gyvūnų skaičius, visų gyvūnų nugaišimo arba numaravimo laikas, vaisingų gyvūnų skaičius, vaikingų patelių skaičius, toksiškumo požymių turinčių gyvūnų skaičius, pastebėtų toksiškumo požymių aprašymas, įskaitant jų pradžios laiką, trukmę ir bet kokio toksinio poveikio sunkumą, pastebėtų klinikinių požymių tėvams ir palikuonims tipai, histopatologinių pakitimų tipai ir atitinkami vados duomenys.

Skaitmeniniai rezultatai turi būti įvertinti taikant atitinkamą visuotinai priimtą statistinį metodą; statistiniai metodai pasirenkami kaip bandymo schemos dalis ir turi būti pagrįsti. Duomenims analizuoti gali padėti dozės ar reakcijos statistiniai modeliai. Ataskaitoje turi būti pakankamas kiekis informacijos apie analizės metodą ir taikytą kompiuterio programą, kad nepriklausomas ekspertas ar statistikos specialistas galėtų iš naujo įvertinti bei atkurti analizės eigą.

### 2.2. REZULTATŲ ĮVERTINIMAS

Šio toksiškumo dviejų kartų dauginimuisi bandymo duomenys įvertinami atsižvelgiant į pastebimą poveikį, įskaitant nekroskopiją ir mikroskopinio tyrimo rezultatus. Įvertinamas ryšis tarp bandomosios medžiagos ir anomalijų buvimo, nebuvimo, dažnumo ir sunkumo, įskaitant makroskopinius pakitimus, nustatytus paveiktus organus, paveiktą vaisingumą klinikinės anomalijas, paveiktą reproduktivumą gebą ir vados charakteristikas, kūno masės pokyčius, poveikį gaištamumui ir bet kokią kitą toksiškinį poveikį arba tokio ryšio nebuvimas. Įvertinant rezultatus reikia atsižvelgti į bandomosios medžiagos fizikines ir chemines savybes ir toksikokinetinius duomenis, jei jų yra.

Tinkamai darant toksiškumo dauginimuisi bandymą turi būti gautas patenkinamas poveikio nesukeliantis dozės įvertis ir neigiamo poveikio dauginimuisi, atsivedimui, laktacijai, postnataliniam vystymuisi, įskaitant augimą ir lytinį brendimą supratimas.

### 2.3. REZULTATŲ AIŠKINIMAS

Toksiškumo dviejų kartų dauginimuisi bandymas suteiks informacijos apie kartotinio medžiagos naudojimo poveikį visais dauginimosi ciklo tarpniais. Pirmiausia bandymas suteikia informacijos apie dauginimosi parametrus ir palikuonių vystymąsi, augimą, brendimą ir išlikimą. Bandymo rezultatai turėtų būti aiškinami atsižvelgiant į pusiau lėtinio toksiškumo, toksiškumo prenataliniam vystymuisi ir į toksikokinetinių bei kitų atliktų bandymų rezultatus. Šio bandymo rezultatai gali būti naudojami įvertinant papildomų cheminės medžiagos bandymų būtinumą. Bandymo rezultatų ekstrapoliavimas žmonėms gali tikti tik tam tikru mastu. Jie labiausiai tinka, kai reikia gauti informacijos apie poveikio nesukeliantis dozes ir leistiną žmonių sąlytį su medžiaga (20) (21) (22) (23).



### 3. ATASKAITOS RENGIMAS

#### 3.1. BANDYMO ATASKAITA

Bandymo ataskaitą turi sudaryti ši informacija:

Bandomoji medžiaga:

- fizinė būseną ir, jei reikia, fizikinės ir cheminės savybės,
- tapatumo duomenys,
- grynumas.

Nešiklis (jei naudojamas):

- nešiklio pasirinkimo pagrindimas, jei tai ne vanduo.

Bandomieji gyvūnai:

- naudota rūšis ir veislė,
- gyvūnų skaičius, amžius ir lytis,
- šaltinis, laikymo sąlygos, pašaras, kraiko medžiagos ir t. t.,
- atskirai kiekvieno gyvūno masė bandymo pradžioje.

Bandymo sąlygos:

- dozės koncentracijos pasirinkimo pagrindimas,
- išsami informacija apie bandomosios medžiagos preparato ruošimą arba jos dėjimą į pašarą, gautos koncentracijos vertės,
- preparato stabilumas ir vienalytiškumas,
- išsami informacija apie bandomosios medžiagos davimą,
- bandomosios medžiagos koncentracijos pašare ar geriamajame vandenyje (ppm) perskaičiavimas į tikrąją dozę (mg/kg kūno masės per parą), jei tinka,
- išsami informacija apie pašaro ir vandens kokybę.

Rezultatai:

- pašaro suvartojimas ir, jei matuojamas, vandens suvartojimas, pašaro efektyvumas (kūno masės padidėjimas vienam suvartoto pašaro gramui), P ir F1 gyvūnų atveju nurodomas suvartotos bandomosios medžiagos kiekis, išskyrus bendrojo buvimo laikotarpį ir mažiausiai paskutinį laktacijos laikotarpio trečdalį,
- absorbcijos duomenys (jei yra),
- P ir F1 gyvūnų, pasirinktų poravimui, kūno masės duomenys,
- vados ir jauniklių masės duomenys,

- tėvų kartų kūno masė numarinant ir absoliučios bei santykinės organų masės duomenys,
- klinikinių požymių tipas, sunkumas ir trukmė (grįžtami ar negrįžtami),
- nugaišimo darant bandymą laikas arba informacija, kad gyvūnai išgyveno iki numarinimo,
- duomenys apie toksinį atsaką pagal lytį ir dozę, įskaitant poravimosi, vaisingumo, gestacijos, atsivedimo, gyvybingumo ir laktacijos rodiklius; atskaitoje nurodomi skaičiai, naudojami rodikliams apskaičiuoti,
- toksinis arba kito tipo poveikis dauginimuisi, palikuonims, postnataliniam augimui ir t. t.,
- nekroskopijos rezultatai,
- išsamus visų histopatologinių rezultatų aprašymas,
- P ir F1 patelių, turinčių normalų ciklą, skaičius ir ciklo trukmė,
- suminis spermatozoidų antskėlidžio uodegoje skaičius, vis labiau judresnių spermatozoidų procentinė dalis, morfologiškai normalių spermatozoidų procentinė dalis ir spermatozoidų, su kiekviena identifikuota anomalija, procentinė dalis,
- poravimosi laikas, įskaitant parų iki poravimosi skaičių,
- gestacijos trukmė,
- implantacijų, geltonkūnių skaičius, vados dydis,
- gimusių gyvū jaunikių skaičius ir poimplantaciniai nuostoliai,
- jaunikių su aiškiai matomais išsigimimais skaičius; pateikiamas silpniausių jaunikių skaičius, jei buvo nustatomas,
- jaunikių fiziniai duomenys ir kiti postnatalinio vystymosi duomenys; įvertinti fiziniai parametrai turi būti pagrįsti,
- jaunikių ir suaugusių gyvūnų funkcinių stebėjimų duomenys, kai tinka,
- statistinis duomenų apdorojimas, jei reikia.

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) Kliefelter, 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.
- 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.36. TOKSIKOKINETIKA

## 1. METODAS

## 1.1. ĮVADAS

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

## 1.2. APIBRĖŽTYS

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

## 1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Nėra.

## 1.4. BANDYMO METODO PRINCIPAS

Bandomoji medžiaga duodama tinkamu būdu. Atsižvelgiant į bandymo tikslą, tam tikrais periodais medžiaga gali būti duodama pavieni ar kartotinėmis dozėmis vienai ar kelioms eksperimentinių grupių gyvūnams. Vėliau, priklausomai nuo bandymo tipo, medžiaga ir (arba) metabolitai nustatomi kūno skysčiuose, audiniuose ir (arba) ekskretuose.

Galima tirti „nežymėtas“ ir „žymėtas“ bandomosios medžiagos formas. Jei naudojamas žymėjimas, tai ji į bandomąją medžiagą turi būti įvesta taip, kad būtų galima gauti kuo išsamesnės informacijos apie junginio likimą.

## 1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

Nėra.

## 1.6. BANDYMO METODO APIBŪDINIMAS

*Pasiruošimas bandymui*

Mažiausiai penkias dienas prieš bandymą sveiki jauni gyvūnų aklimatizuojami laboratorinėmis sąlygomis. Prieš pradėdamas bandymą gyvūnai atsitiktinės atrankos būdu atrenkami ir suskirstomi į bandomąją bei kontrolinę grupes. Ypatingais atvejais galima naudoti labai jaunus gyvūnus, vaikingas pateles, bei gyvūnus, iš anksto paveiktus bandomąja medžiaga.

*Bandymo sąlygos**Eksperimentiniai gyvūnai*

Toksikokinetiniai bandymai gali būti atliekami panaudojant vieną ar daugiau tinkamų gyvūnų rūšių, ir reikia atsižvelgti į rūšis, kurios yra naudojamos ir kurios pasirinktos naudoti kituose tos pačios bandomosios medžiagos toksikologiniuose bandymuose. Jei bandyme 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. Atsižvelgti į lytį nėra būtina, tačiau tam tikrais atvejais gali reikėti išbandyti abi lytis. Jei abi lytys reaguoja skirtingai, reikėtų ištirti po keturis kiekvienos lyties gyvūnus. Tiriant negraužikus, galima naudoti mažiau gyvūnų. Kai tiriamas medžiagos pasiskirstymas audiniuose, sprendžiant dėl grupės dydžio bandymo pradžioje reikėtų atsižvelgti į gyvūnų, kurie bus numarinti nustatytais laiko momentais, skaičių ir į laiko momentų, kurių metu bus numarinami ir tiriami gyvūnai, skaičių.

Kai tiriamas metabolizmas, tai grupės dydis priklauso nuo bandymo poreikių. Atliekant bandymus su daug dozių ir bandymus, kurių metu numatyti keli laiko momentai [kai gyvūnai bus ištiriami], sprendžiant dėl grupės dydžio reikėtų atsižvelgti į tuos laiko momentus ir numatomus numarinimus, tačiau bet koku atveju grupėje turi būti ne mažiau kaip du gyvūnai. Grupė turėtų būti pakankamai didelė, kad būtų galima tinkamai apibūdinti bandomosios medžiagos ir (ar) metabolitų pasisavinimą, stabilizavimąsi bei pašalinimą.

### Dozės

Kai duodama pavienė dozė, turėtų būti išbandomos mažiausiai dvi jos koncentracijos. Turėtų būti duodama maža, nesukelianti toksinių poveikių, dozė ir didelė dozė, kuriai esant, pasireiškia toksiniai poveikiai arba galėtų pakisti toksikokinetiniai parametrai.

Kai medžiaga duodama kartotinėmis dozėmis, paprastai užtenka tik mažos koncentracijos dozės, tačiau ypatingais atvejais gali reikėti naudoti ir didelės koncentracijos dozę.

### Davimo būdas

Toksikokinetinių bandymų metu reikėtų naudoti tą patį davimo būdą ir, jei reikia, tą patį nešiklį, kuris buvo naudojamas ar buvo pasirinktas naudoti kituose toksikologiniuose bandymuose. Bandomoji medžiaga eksperimentiniams gyvūnams paprastai duodama su zondų ar pašaru, uždedama ant odos arba duodama įkvėpti konkrečiais laiko momentais. Bandomosios medžiagos intraveninė injekcija gali būti naudinga siekiant nustatyti santykinę medžiagos, duodamos kitais būdais, absorbciją. Be to, atlikus bandomosios medžiagos intraveninę injekciją galima gauti naudingos informacijos apie jos pasiskirstymą.

Reikėtų atsižvelgti į nešiklio ir bandomosios medžiagos interferencijos galimybę. Reikėtų atkreipti dėmesį į absorbcijos skirtumus, kai bandomosios medžiagos duodamos per zondą ir su pašaru, bei nustatyti tikslią bandomosios medžiagos, duodamos su pašaru, dozę.

### Stebėjimo laikotarpis

Kiekvieną dieną reikėtų stebėti visus gyvūnus bei registruoti toksiškumo požymius ir kitus svarbius klinikiškus parametrus, įskaitant poveikio pasireiškimo laiką, laipsnį bei trukmę.

### Bandymo eiga

Pasvėrus visus bandomuosius gyvūnus, atitinkamu būdu jiems duodama bandomoji medžiaga. Jeigu reikia, prieš duodant medžiagą bandomiesiems gyvūnams neduodama ėsti.

### Absorbcija

Duodamos medžiagos absorbcijos greitis bei apimtis gali būti įvertinami įvairiais metodais, panaudojant arba nenaudojant etaloninių grupių<sup>(1)</sup>, pvz.:

- nustatant bandomosios medžiagos ir (ar) metabolitų kiekį ekskretuose, tokiuose kaip šlapimas, tulžis, išmatos, iškvėptas oras ir gyvūno lavone,
- lyginant bandomąją ir kontrolinę arba bandomąją ir etaloninę grupes pagal biologinį atsaką (pvz., atliekant ūmaus toksiškumo bandymus),
- lyginant bandomąją ir etaloninę grupes pagal medžiagos ekskreciją per inkstus,
- nustatant bandomosios medžiagos ir (ar) metabolitų zoną, esančią žemiau plazmos ir laiko kreivės ir gautus duomenis lyginant su etaloninės grupės bandymų duomenimis.

### Pasiskirstymas

Šiuo metu medžiagos pasiskirstymą galima analizuoti dviem būdais:

- naudingos kokybinės informacijos gaunama tiriant visą kūną autoradiografijos metodu,
- kiekybinės informacijos gaunama skirtingu laiko momentu po veikimo bandomąja medžiaga numariant gyvūnus bei nustatant bandomosios medžiagos ir (ar) metabolitų kiekį bei koncentraciją audiniuose ir organuose.

<sup>(1)</sup> Šiame metode: etaloninė grupė – tokia grupė, kurioje bandomosios bandomosios medžiagos duodamos kitokiu būdu siekiant užtikrinti dozės biologinį tinkamumą.

## Ekskrecija

Tiriant ekskreciją, surenkamas šlapimas, išmatos, iškvėptas oras ir tam tikrais atvejais, tulžis. Pasibaigus veikimui bandomąja medžiaga, reikėtų kelis mėnesius nustatyti bandomosios medžiagos ir (ar) metabolitų kiekį šiuose ekskretuose tol, kol ekskrecijos būdu pašalinins apie 95 % duotos medžiagos, arba kai praeis savaitė, priklausomai nuo to, kas įvyksta pirmiau.

Ypatingais atvejais reikėtų apsvarstyti bandomosios medžiagos ekskreciją į laktacijos bandyme naudojamų gyvūnų pieną.

## Metabolizmas

Biologiniai mėginiai turėtų būti tiriami atitinkamais metodais tam, kad būtų nustatyta metabolizmo mastas ir pobūdis. Reikėtų nustatyti metabolitų struktūrą bei pasiūlyti galimus metabolinės apykaitos kelius, jei anksčiau atliktų toksikologinių bandymų metu liko neišspręstų problemų. Bandymai *in vitro*, padėtų gauti informacijos apie metabolinės apykaitos kelius.

Išsamesnės informacijos 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 bandomosios medžiagos susirišimo su makromolekulėmis tyrimas.

## 2. DUOMENYS

Atsižvelgiant į atlikto bandymo pobūdį, duomenys turėtų būti pateikiami apibendrintai lentelėse ir, jei reikia, pateikiant grafinės informacijos. Kiekvienos tirtos grupės atveju reikėtų nurodyti, jei tinkama, 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. BANDYMO ATASKAITA

Atsižvelgiant į atlikto bandymo pobūdį, bandymo ataskaitoje, jei įmanoma, turėtų būti pateikiama tokia informacija:

- panaudota rūšis, veislė, šaltinis, aplinkos sąlygos,
- žymėtų medžiagų, jei šios buvo naudojamos, apibūdinimas,
- dozių dydžiai ir kaip dažnai jos buvo duodamos,
- davimo būdas (-ai) ir visi naudoti nešikliai,
- užregistruotas toksinis ir kitoks poveikis,
- bandomosios medžiagos ir (ar) metabolitų biologiniuose mėginiuose, įskaitant iškvėptą orą, nustatymo metodai,
- lyties, dozės, režimo, laiko, audinių bei organų atžvilgiu atliktų matavimų suvedimas į lenteles,
- pateikiamas ekskrecijos ir absorbcijos mastas bėgant laikui,
- metabolitų identifikacijos biologiniuose mėginiuose bei apibūdinimo metodai,
- biocheminiai metabolizmo įvertinimo metodai,
- galimi metabolinės apykaitos keliai,

— rezultatų aptarimas,

— rezultatų aiškinimas.

3.2. ĮVERTINIMAS IR AIŠKINIMAS

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

4. **NUORODOS**

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

B.37. **ŪMAI VEIKIANT ORGANINIAIS FOSFORO JUNGINIAIS SUKELTO UŽDELSTO NEUROTOKSIŠKUMO BANDYMAS**

1. **METODAS**

1.1. ĮVADAS

Siekiant įvertinti medžiagų toksiškumą reikia atsižvelgti į tam tikrų klasių medžiagų potencialą sukelti tam tikrų tipų neurotoksinį poveikį, kuris nenustatomas įprastais toksiškumo bandymais. Pastebėta, kad kai kurie organiniai fosforo junginiai sukelia uždelstą neurotoksinį poveikį, tad reiktų apsvarstyti šių medžiagų įvertinimą.

Siekiant nustatyti medžiagas, sukeliančias uždelstą polineuropatiją, gali būti taikomi atrankos bandymai *in vitro*, tačiau neigiami bandymo *in vitro* duomenys dar neįrodo, kad duotoji medžiaga nėra neurotoksiška.

Žiūrėti Bendrojo įvado B dalį.

1.2. APIBRĖŽTYS

Organiniai fosforo junginiai apima organinio fosforo esterius, tioesterius ar organinio fosforo anhidridus, taip pat organinio fosforo, organinio fosfono ar organinio fosforamido rūgštis ar giminingas fosforotiono, fosforonotiono ar fosforotioamido rūgštis, ar kitas medžiagas, kurios gali sukelti uždelstą neurotoksinį poveikį, būdingą šiai medžiagų klasei.

Uždelstas neurotoksiškumas yra sindromas, susijęs su ataksijos, nugaros smegenų ir periferinio nervo distalinės aksonopatijos ilgai trunkančiu uždelsimu bei neuropatijos sukeltu esterazės slopinimu nervų audiniuose.

1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Norint įrodyti, jog laboratorinėmis sąlygomis bandomųjų rūšių atsakas labai nesikeičia, etaloninės medžiagos gali būti išbandytos su teigiama kontroline gyvūnų grupe.

Plačiai naudojamas neurotoksikantas yra tri-o-tolilfosfatas (CAS 78–30–8, Einecs 201–103–5, CAS nomenklatūra: fosforo rūgštis, tris(2-metilfenil)esteris), taip pat žinomas kaip tris-o-krezilfosfatas.

1.4. BANDYMO METODO PRINCIPAS

Naminėms vištoms, kurios, jeigu reikia, yra apsaugotos nuo ūmaus cholinerginio poveikio, per virškinamąjį traktą duodama bandomosios medžiagos vienkartinė dozė. 21 dieną stebimi gyvūnų elgesio nukrypimai, ataksija ir paralyžius. Paprastai praėjus 24 ir 48 valandoms po dozavimo iš kiekvienos grupės atsitiktiniu atrankos būdu paimtoms vištoms atliekami biocheminiai tyrimai, t. y. nustatomas neuropatijos sukeltas esterazės slopinimas. Praėjus 21 dienai po medžiagos poveikio, likusios vištos numarinamos ir tam tikri nervų audiniai ištiriami histopatologiškai.

1.5. BANDYMO METODO APRAŠYMAS

1.5.1. **Pasiruošimas**

Sveikos jaunos suaugusios vištos, nesergančios atlikti bandymą trukdančiomis virusinėmis ligomis, negaunančios medikamentų ir neturinčios eisenos pakitimų, atsitiktinės atrankos principu paskirstomos į bandomąją ir kontrolinę grupes ir mažiausiai 5 dienas prieš bandymą aklimatizuojamos laboratorijos sąlygomis.

Reikia naudoti pakankamai didelius narvus arba aptvarus, kurie leistų vištoms laisvai judėti ir būtų lengva stebėti jų eisena.



Bandomoji medžiaga turėtų būti dozuoama per virškinamąjį traktą, naudojant zondą, želatinines kapsules arba lygiaverčiu metodu. Skysčiai gali būti duodami neskiesti arba ištirpinti nešiklyje, pavyzdžiui, kukurūzų aliejuje; kietosios medžiagos turėtų būti ištirpinamos, nes didelės kietųjų medžiagų dozės želatininėse kapsulėse gali būti neefektyviai absorbuojamos. Jei naudojamas kitas nešiklis nei vanduo, jo toksinės savybės turi būti žinomos, o jeigu nežinomos, tai prieš bandymą jos turi būti nustatytos.

#### 1.5.2. **Bandymo sąlygos**

##### 1.5.2.1. *Bandomieji gyvūnai*

Rekomenduojamos nuo 8 iki 12 mėnesių amžiaus jaunos suaugusios naminės vištos dedeklės (*Gallus gallus domesticus*). Turėtų būti naudojamos standartinio dydžio veislės ir atmainos vištos, užaugintos sąlygomis, leidžiančiomis laisvai judėti.

##### 1.5.2.2. *Skaičius ir lytis*

Be bandomosios grupės turi būti dar nešiklio kontrolinė grupė ir teigiamos kontrolės grupė. Su nešiklio kontrolinės grupės gyvūnais reikia elgtis lygiai taip pat kaip ir su bandomaisiais gyvūnais, išskyrus tai, kad jie negauna bandomosios medžiagos.

Kiekvienoje paukščių grupėje turi būti toks vištų skaičius, kad mažiausiai šešias būtų galima numarinti biocheminiams tyrimams (po tris tam tikrais dviem laiko momentais) ir kad po 21 stebėjimo dienos patologiniams tyrimams išgyventų dar šešios vištos.

Teigiamos kontrolės grupė gali būti bandoma paraleliai su kitomis grupėmis arba tai gali būti nesenai atlikto ankstesnio bandymo kontrolinė grupė. Šioje grupėje turi būti mažiausiai šešios vištos, paveiktos žinomais uždelsto veikimo neurotoksikantais, trys vištos yra skirtos biocheminiams tyrimams ir trys patologijai tirti. Rekomenduojama periodiškai atnaujinti ankstesnių bandymų duomenis. Kai bandymų laboratorija pakeičia kurį nors esminį bandymo elementą (pvz., vištų atmainą, pašarus, laikymo sąlygas), turi būti gauti nauji teigiamos kontrolės duomenys.

##### 1.5.2.3. *Dozės dydžiai*

Pagrindiniame bandyme naudotinių dozių dydžiams nustatyti reikia atlikti išankstinį bandymą su atitinkamu vištų ir dozių grupių skaičiumi. Kad būtų galima nustatyti pagrindinio bandymo dozių ribas, paprastai išankstiniame bandyme turi būti tam tikras gaištamumas. Norint užkirsti kelią dėl ūmaus cholinerginio poveikio kylančioms žūtims, galima naudoti atropiną ar kitą apsauginę medžiagą, kuri netrukdytų pasireikšti uždelsto neurotoksiškumo atsakams. Siekiant apskaičiuoti maksimalią nemirtiną bandomosios medžiagos dozę, galima panaudoti daugybę tiriamųjų metodų (žiūrėkite metodą B. 1 bis). Parenkant dozę gali būti naudingi anksčiau atliktų bandymų su vištomis duomenys arba bet kokia kita toksikologinė informacija.

Bandomosios medžiagos dozės dydis pagrindiniame bandyme turi būti kuo aukštesnis atsižvelgiant į išankstinio bandymo rezultatus ir aukščiausią ribinę 2 000 mg/kg kūno masės dozę. Kad ir koks būtų gaištamumas, po 21 dienos turi likti reikiamas išgyvenusių paukščių skaičius – šeši biocheminiams ir šeši histologiniams tyrimams. Siekiant užkirsti kelią gaištamumui dėl ūmaus cholinerginio poveikio, galima naudoti atropiną arba bet kurią kitą apsauginę medžiagą, netrukdančią pasireikšti uždelsto neurotoksiškumo atsakams.

##### 1.5.2.4. *Ribinis bandymas*

Jeigu tirtas dozės lygis, ne žemesnis, negu 2 000 mg/kg kūno masės, nesukelia pastebimų toksinių poveikių ir jeigu iš turimų duomenų apie struktūriškai panašias medžiagas toksinio poveikio nesitikima, didesnių dozių bandymai nebūtini. Toks ribinis bandymas netaikomas tais atvejais, kai atsižvelgiant į žmonių sąlytį su medžiaga reikia naudoti didesnio dydžio dozę.

##### 1.5.2.5. *Stebėjimo laikotarpis*

Stebėjimo laikotarpis turėtų trukti 21 dieną.

### 1.5.3. **Bandymo eiga**

Po to, kai paukštis gauna apsauginę medžiagą, kuri užkerta kelią nuo dėl ūmaus cholinerginio poveikio galimai žūčiai, duodama bandomosios medžiagos vienkartinė dozė.

#### 1.5.3.1. *Bendrasis stebėjimas*

Stebėjimai prasideda tuoj pat po medžiagos davimo. Pirmas dvi dienas visos vištos atidžiai stebimos kelis kartus, o vėliau mažiausiai vieną kartą per dieną 21 dieną arba iki nustatyto numarinimo. Visi toksiškumo požymiai turi būti registruojami, žymint jų pradžią, tipą, ryškumą ir elgesio nukrypimų trukmę. Ataksiją reikėtų vertinti mažiausiai pagal keturių lygių skalę, taip pat reikėtų nurodyti paralyžių. Norint pastebėti minimalų toksinį poveikį, vištos, atrinktos patologijai, mažiausiai du kartus per savaitę išimamos iš narvų ir stebimas jų judamasis aktyvumas, priverčiant jas judėti, pvz., kopėčiomis. Kai pastebimi gaištantys ir patiriantys didelės kančias bei skausmą paukščiai, jie išimami iš narvų, humaniškai numarinami ir atliekama jų nekroskopija.

#### 1.5.3.2. *Kūno masė*

Prieš bandomosios 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 bandomosios ir nešiklio kontrolinės grupės bei trys vištos iš pozityvinės kontrolinės grupės (jei ši grupė paraleliai bandoma) praėjus kelioms dienoms po dozavimo numarinamos, išimamos galvos smegenys ir juosmens dalies nugaros smegenys bei ištiriamas neuropatijos sukeltas esterazės slopinimo aktyvumas. Kartais naudinga ištirti sėdimosio nervo audinio neuropatijos sukeltą esterazės slopinimo aktyvumą. Paprastai praėjus 24 valandoms numarinami trys kontrolinės ir trys bandomosios grupės paukščiai, o praėjus 48 valandoms, dar po tris, tuo tarpu trys pozityvinės kontrolės vištos numarinamos po 24 valandų. Jeigu klinikiniai intoksikacijos požymiai (tai dažnai gali būti nustatyta stebint cholinerginių požymių pradžios laiką) rodo, kad toksiška medžiaga perduodama labai lėtai, tada geriau paukščių audinių pavyzdžius imti du kartus tarp 24 ir 72 valandų po dozavimo.

Jei laikoma reikalinga, galima ištirti acetilcholinesterazę (AChE). Tačiau gali įvykti spontaninė AChE reaktyvacija *in vivo*, o tai gali sąlygoti nepakankamą medžiagos, kaip AChE inhibitoriaus, stiprumo įvertinimą.

#### 1.5.3.4. *Bendroji nekroskopija*

Bendrosios nekroskopijos metu reikia apžiūrėti visų gyvūnų galvos bei nugaros smegenų išvaizdą.

#### 1.5.3.5. *Histopatologinis ištyrimas*

Išgyvenusių visą stebėjimo periodą ir nepanaudotų biocheminiams tyrimams paukščių nervų audiniai turi būti mikroskopiškai ištirti. Audiniai turi būti fiksuojami *in situ*, naudojant perfuzijos metodą. Reikia atlikti smegenėlių (vidurinių-pailgąjį lygį), pailgųjų smegenų, nugaros smegenų ir periferinių nervų pjūvius. Reikia atlikti nugaros smegenų pjūvius iš viršutinio kaklinio segmento, vidurinės-krūtininės ir juosmens-kryžmens dalių. Reikia atlikti distalinių blauzdikaulio nervų ir jo atšakų į skrandžio raumenį bei sėdimosio nervo pjūvius. Šiuos pjūvius reikia dažyti atitinkamais dažais - būdingais mielinui ir aksonui.

## 2. **DUOMENYS**

Pasirinktų metodų (biochemijos, histopatologijos ir elgesio stebėjimo) požiūriu gauti neigiami rezultatai paprastai nereikalauja uždelsto neurotoksiškumo bandymo tęsimo. Tik šiuo požiūriu dviprasmiai arba negalutiniai rezultatai gali reikalauti tolesnio įvertinimo.

Turėtų būti pateikiami kiekvieno paukščio duomenys. Be to, visi duomenys turi būti pateikiami lentelių forma, nurodant kiekvienoje tirtroje grupėje bandymo pradžioje buvusių paukščių skaičių, paukščių su pažeidimais, elgesio ar biocheminiais pakitimais skaičių, šių pažeidimų ar pakitimų tipus ir jų sunkumo laipsnį bei paukščių procentą su kiekvieno pažeidimo ar pakitimo tipu ir sunkumo laipsniu.

Gautus duomenis reikia vertinti pagal pakitimų pasireiškimą ir sunkumo laipsnį bei nustatant koreliacinius ryšius tarp elgesio, biochemijos ir histopatologinių pakitimų bei visų kitų pastebėtų pakitimų bandomojoje ir kontrolinėje grupėse.

Skaitmeniniai rezultatai turėtų būti apdoroti tinkamais ir priimtinais statistiniais metodais. Statistiniai metodai turėtų būti pasirinkti planuojant bandymą.

### 3. ATASKAITOS PATEIKIMAS

#### BANDYMO ATASKAITA

Bandymo ataskaitoje, jei įmanoma, turėtų būti ši informacija:

Bandomieji gyvūnai:

- panaudotos atmainos,
- gyvūnų skaičius ir amžius,
- gavimo šaltinis, laikymo sąlygos ir kt.,
- kiekvieno gyvūno kūno masė bandymo pradžioje.

Bandymo sąlygos:

- išsami informacija apie bandomosios medžiagos preparatą, stabilumą ir homogeniškumą, kur tinkama,
- nešiklio pasirinkimo pagrindimas,
- informacija apie bandomosios medžiagos davimą,
- informacija apie pašarų ir vandens kokybę,
- dozės pasirinkimo pagrindimas,
- informacija apie duotas dozes, įskaitant naudotą nešiklį, jo tūrį ir duotos medžiagos fizikinę formą,
- apsauginės medžiagos tapatumas ir išsami informacija apie jos davimą.

Rezultatai:

- kūno masės duomenys,
- grupės toksinio atsako duomenys, įskaitant nugaišimą,
- pastebėti klinikiniai pokyčiai, jų sunkumo laipsnis ir trukmė (ar grįžtami, ar ne),
- smulkus biocheminių metodų ir gautų duomenų aprašymas,
- nekroskopijos duomenys,
- smulkus visų gautų histopatologinių duomenų aprašymas,

— statistinis rezultatų apdorojimas ten, kur tinka.

Rezultatų aptarimas.

Išvados.

4. **NUORODOS**

Šis metodas atitinka OECD TG 418.

**B.38. ORGANINIŲ FOSFORO JUNGINIŲ SUKELTO UŽDELSTO NEUROTOKSIŠKUMO 28 DIENŲ BANDYMAS****1. METODAS****1.1. ĮVADAS**

Siekiant įvertinti medžiagų toksiškumą reikia atsižvelgti į tam tikrų klasių medžiagų potencialą sukelti tam tikrų tipų neurotoksinį poveikį, kuris nenustatomas įprastais toksiškumo bandymais. Pastebėta, kad kai kurie organiniai fosforo junginiai sukelia uždelstą neurotoksinį poveikį, tad reiktų apsvarstyti šių medžiagų įvertinimą.

Siekiant nustatyti medžiagas, sukeliančias uždelstą polineuropatiją, gali būti taikomi atrankos bandymai *in vitro*, tačiau neigiami bandymo *in vitro* duomenys dar neįrodo, kad duotoji medžiaga nėra neurotoksiška.

Atliekant šį 28 dienų uždelsto neurotoksiškumo bandymą gaunama informacijos apie riziką sveikatai, kylančią gaunant medžiagą pakartotinai tam tikrą laiką tarpą. Šiuo bandymu gaunama informacijos apie reakciją į dozę bei galima nustatyti nepastebėto neigiamo poveikio ribą, reikalingą nustatant medžiagos saugumo kriterijus.

Žiūrėti Bendrojo įvado B dalį.

**1.2. APIBRĖŽTYS**

Organiniai fosforo junginiai apima organinio fosforo esterius, tioesterius ar organinio fosforo anhidridus, taip pat organinio fosforo, organinio fosfono ar organinio fosforamido rūgštis ar giminingas fosforotiono, fosforonotiono ar fosforotioamido rūgštis, ar kitas medžiagas, kurios gali sukelti uždelstą neurotoksinį poveikį, būdingą šiai medžiagų klasei.

Uždelstas neurotoksiškumas yra sindromas, susijęs su ataksijos, nugaros smegenų ir periferinio nervo distalinės aksonopatijos ilgai trunkančiu uždelsimu bei neuropatijos sukeltu esterazės slopinimu nervų audiniuose.

**1.3. BANDYMO METODO PRINCIPAS**

Naminėms vištoms per virškinamąjį traktą 28 dienas kasdien duodama bandomoji medžiaga. Medžiagos davimo periodu ir praėjus 14 dienų po to bent vieną kartą dienoje gyvūnai stebimi siekiant nustatyti jų elgesio nukrypimus, ataksiją ir paralyžių. Paprastai praėjus 24 ir 48 valandoms po paskutinio dozavimo, iš kiekvienos grupės atsitiktiniu atrankos būdu paimtoms vištoms atliekami biocheminiai tyrimai, t. y. nustatomas neuropatijos sukeltas esterazės slopinimas. Praėjus dviem savaitėms po paskutinės dozės, liksios vištos numarinamos ir tam tikri nervų audiniai ištiriami histopatologiškai.

**1.4. BANDYMO METODO APRAŠYMAS****1.4.1. Pasiruošimas**

Sveikos jaunos suaugusios vištos, nesergančios atlikti bandymą trukdančiomis virusinėmis ligomis, negaunančios medikamentų ir neturinčios eisenos pakitimų, atsitiktinės atrankos principu paskirstomos į bandomąją ir kontrolinę grupes ir mažiausiai 5 dienas prieš bandymą aklimatizuojamos laboratorijos sąlygomis.

Turi būti naudojami pakankamai dideli narvai arba aptvarai, kurie leistų vištoms laisvai judėti bei laisvai stebėti jų eisena.

Bandomoji medžiaga kasdien septynias dienas per savaitę dozuoja per virškinamąjį traktą, naudojant zondą arba želatinines kapsules. Skysčiai gali būti duodami neskiesti arba ištirpinti nešiklyje, pavyzdžiui, kukurūzų aliejuje; kietosios medžiagos turėtų būti ištirpinamos, nes didelės kietųjų medžiagų dozės želatininėse kapsulėse gali būti neefektyviai absorbuojamos. Jei naudojamas kitas nešiklis nei vanduo, jo toksinės savybės turi būti žinomos, o jeigu nežinomos, tai prieš bandymą jos turi būti nustatytos.

- 1.4.2. **Bandymo sąlygos**
- 1.4.2.1. *Bandomieji gyvūnai*
- Rekomenduojamos nuo 8 iki 12 mėnesių amžiaus jaunos suaugusios naminės vištos dedeklės (*Gallus gallus domesticus*). Turėtų būti naudojamos standartinio dydžio veislės ir atmainos vištos, užaugintos sąlygomis, leidžiančiomis laisvai judėti.
- 1.4.2.2. *Skaičius ir lytis*
- Reikia sudaryti mažiausiai tris bandomąsias grupes bei vieną nešiklio kontrolinę grupę. Su nešiklio kontrolinės grupės gyvūnais reikia elgtis lygiai taip pat kaip ir su bandomaisiais gyvūnais, išskyrus tai, kad jie negautų bandomosios medžiagos.
- Kiekvienoje paukščių grupėje reikia panaudoti tokį skaičių vištų, kad mažiausiai šešias galima būtų numarinti biocheminiams tyrimams (po tris, praėjus dviems skirtingiems laiko tarpams) ir, kad praėjus 14 dienų po paskutinio dozavimo pataloginiams tyrimams išgyventų dar šešios vištos.
- 1.4.2.3. *Dozių dydžiai*
- Dozės dydžius reikia parinkti atsižvelgiant į uždelsto neurotoksiškumo ūmaus bandymo rezultatus arba į jau turimus bandomosios medžiagos toksiškumo ar kinetinius duomenis. Pasirinkta didžiausia dozė turi sukelti toksinį poveikį, geriausiai uždelstą neurotoksinį poveikį, tačiau turi nesukelti gyvūno žūties ar nepakeliamų kančių. Kiti mažėjančia tvarka einantys dozių lygiai turi sukelti atitinkamai mažesnius pokyčius (atsakus), o mažiausias dozės lygis turėtų nesukelti pastebimų neigiamų poveikių.
- 1.4.2.4. *Ribinis bandymas*
- Jeigu tirtas dozės lygis, ne žemesnis, negu 1 000 mg/kg kūno masės/parai nesukelia pastebimų toksinių poveikių ir jeigu iš turimų duomenų apie struktūriškai panašias medžiagas nesitikima toksiškumo, didesnių dozių bandymai nebūtini. Toks ribinis bandymas netaikomas tais atvejais, kai atsižvelgiant į tikėtiną žmonių sąlytį su medžiaga reikia naudoti didesnio dydžio dozę.
- 1.4.2.5. *Stebėjimo periodas*
- Visi paukščiai stebimi mažiausiai vieną kartą per dieną visą medžiagos dozavimo periodą ir 14 dienų po jo, iki atliekamas skrodimas.
- 1.4.3. **Bandymo eiga**
- Paukščiams bandomoji medžiaga duodama 28 dienas kasdien septynias dienas per savaitę.
- 1.4.3.1. *Bendrasis stebėjimas*
- Stebėjimai prasideda tuoj pat po medžiagos davimo. 28 dozavimo dienas ir 14 dienų po to visos vištos atidžiai stebimos mažiausiai vieną kartą per dieną arba iki nustatyto numarinimo. Visi toksiškumo požymiai turi būti registruojami, žymint jų pradžią, tipą, sunkumo laipsnį ir trukmę. Stebėjimas turi apimti elgesio nukrypimus, bet neturi jais apsiriboti. Ataksiją reikėtų vertinti mažiausiai pagal keturių lygių skalę ir reikėtų žymėti paralyžių. Norint pastebėti minimalų toksinį poveikį, vištos mažiausiai du kartus per savaitę išimamos iš narvų ir stebimas jų judamasis aktyvumas, priverčiant judėti, pvz., kopėčiomis. Kai pastebimi gaištantys ir patiriantys dideles kančias bei skausmą paukščiai, jie išimami iš narvų, humaniškai numarinami ir atliekama jų nekroskopija.
- 1.4.3.2. *Kūno masė*
- Prieš pirmąjį bandomosios medžiagos davimą visas vištas reikia pasverti, vėliau tai daroma mažiausiai vieną kartą per savaitę.
- 1.4.3.3. *Biochemija*
- Atsitiktinės atrankos būdu šešios vištos iš kiekvienos bandomosios ir nešiklio kontrolinės grupių, praėjus kelioms dienoms po paskutinės dozės, numarinamos, išimamos galvos smegenys ir juosmens dalies nugaros smegenys bei ištiriamas neuropatijos sukeltas esterazės slopinimo aktyvumas. Kartais naudinga ištirti sėdimąjo nervo audinio neuropatijos sukeltą esterazės slopinimo aktyvumą. Paprastai, praėjus 24

valandoms po paskutinės dozės, numarinami trys kontrolinės ir trys kiekvienos bandomosios grupės paukščiai, o praėjus 48 valandoms, dar po tris. Jeigu ūmaus arba kitų bandymų (pvz. toksikokinetinių) duomenys rodo, kad po paskutinės dozės geriau pasirinkti kitą numarinimo laiką negu siūloma, tuomet galima pasirinkti kitą laiką ir pridėti atitinkamus dokumentus.

Taip pat galima tirti acetilcholinesterazę (AChE). Tačiau gali įvykti spontaniinė AChE reaktyvacija *in vivo*, o tai gali sąlygoti nepakankamą medžiagos, kaip AChE inhibitoriaus, stiprumo įvertinimą.

#### 1.4.3.4. *Bendroji nekroskopija*

Bendrosios nekroskopijos, kuri atliekama numarintiems ir nugaišusiems gyvūnams, metu reikia apžiūrėti visų gyvūnų galvos bei nugaros smegenų išvaizdą.

#### 1.4.3.5. *Histopatologinis ištyrimas*

Išgyvenusių visą stebėjimo periodą ir nepanaudotų biocheminiams tyrimams paukščių nervų audiniai turi būti mikroskopiškai ištirti. Audiniai turi būti fiksuojami *in situ*, naudojant perfuzijos metodą. Reikia tirti smegenėlių (vidurinių-pailgąjį lygį), pailgųjų smegenų, nugaros smegenų ir periferinių nervų dalis. Reikia atlikti nugaros smegenų pjūvius iš viršutinio kaklinio segmento, vidurinės-krūtininės ir juosmens-kryžmens dalių. Reikia atlikti distalinių blauzdikaulio nervų ir jo atšakų į skrandžio raumenį bei sėdimąjo nervo pjūvius. Šiuos pjūvius reikia dažyti atitinkamais dažais - būdingais mielinui ir aksonui. Pradžioje reikia mikroskopiškai ištirti visų kontrolinės ir didžiausios dozės grupių paukščių fiksuotus audinius. Jei didžiausios dozės grupėje nustatomi pakitimai, reikėtų 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 bandymo tęsimo. Tik šiuo požiūriu dviprasmiai arba negalutiniai rezultatai gali reikalauti tolesnio įvertinimo.

Turėtų būti pateikiami kiekvieno paukščio duomenys. Be to, visi duomenys turi būti pateikiami lentelių forma, nurodant kiekvienoje tirtoje grupėje bandymo pradžioje buvusių paukščių skaičių, paukščių su pažeidimais, elgesio ar biocheminiais pakitimais skaičių, šių pažeidimų ar pakitimų tipus ir sunkumo laipsnį bei paukščių procentą su kiekvieno pažeidimo ar pakitimo tipu ir sunkumo laipsniu.

Gautus duomenis reikia vertinti pagal pakitimų pasireiškimą ir sunkumo laipsnį bei nustatant koreliacinius ryšius tarp elgesio, biochemijos ir histopatologinių pakitimų bei visų kitų pastebėtų pakitimų bandomosiose ir kontrolinėje grupėse.

Skaitmeniniai rezultatai turėtų būti apdoroti tinkamais ir priimtinais statistiniais metodais. Statistiniai metodai turėtų būti pasirinkti planuojant bandymą.

## 3. **ATASKAITOS PATEIKIMAS**

### BANDYMO ATASKAITA

Bandymo ataskaitoje, jei įmanoma, pateikiama ši informacija:

Bandomieji gyvūnai:

- panaudotos atmainos,
- gyvūnų skaičius ir amžius,
- gavimo šaltinis, laikymo sąlygos ir kt.,
- kiekvieno gyvūno kūno masė bandymo pradžioje.

Bandymo sąlygos:

- išsami informacija apie bandomosios medžiagos paruošimą, stabilumą ir homogeniškumą, kur tinkama,
- tirpiklio pasirinkimo pagrindimas,
- išsami informacija apie poveikį bandomąja medžiaga,
- išsami informacija apie pašarų ir vandens kokybę,
- dozės pasirinkimo pagrindimas,
- informacija apie duotas dozes, įskaitant naudotą nešiklį, jo turį ir duotos medžiagos fizikinę formą,
- pasirinkus biocheminiams tyrimams kitą laiką (ne po 24 ir 48 valandų), tokio pasirinkimo pagrindimas.

Rezultatai:

- kūno masės duomenys,
- duomenys apie toksinį atsaką pagal dozės lygį, įskaitant nugaišimą,
- nepastebimo neigiamo poveikio riba,
- pastebėti klinikiniai pokyčiai, jų sunkumo laipsnis ir trukmė (grįžtami ar ne),
- smulkus biocheminių metodų ir gautų duomenų aprašymas,
- nekroskopijos duomenys,
- smulkus visų gautų histopatologinių duomenų aprašymas,
- statistinis rezultatų apdorojimas ten, kur tinka.

Rezultatų aptarimas.

Išvados.

4.

#### **NUORODOS**

Šis metodas atitinka OECD TG 419.



B.39. ŽINDUOLIŲ KEPENŲ LĄSTELIŲ NENUMATYTOS DNR SINTEZĖS (NDS) BANDYMAS *IN VIVO*

## 1. METODAS

Šis metodas atitinka OECD TG 486 – Žinduolių kepenų ląstelių nenumatytos DNR sintezės (NDS) bandymą *in vivo* (1997).

## 1.1. ĮVADAS

Žinduolių kepenų ląstelių nenumatytos DNR sintezės (NDS) bandymo *in vivo* tikslas – nustatyti medžiagas, kurios sukelia DNR pažeidimų reparaciją žinduolių, paveiktų bandomąja medžiaga, kepenų ląstelėse 1, 2, 3, 4.

Šiuo bandymu galima iširti genotoksinę cheminių medžiagų poveikį kepenims. Galutinis nustatytas dydis parodo, kad kepenų ląstelėse įvyksta DNR pažeidimai, o vėliau jų reparaciją. Apskritai, absorbuotų junginių metabolizmo pagrindinė vieta yra kepenys. Todėl kepenys yra tinkamas DNR pažeidimų bandymo *in vivo* objektas.

Jeigu nustatoma, kad bandomoji medžiaga nepasiekia tikslinio audinio, šio bandymo metodo nereikėtų naudoti.

Nenumatytos DNR sintezės (NDS) produktai analizuojami, įvertinant žymėtų nukleozidų transportą į ląsteles, kuriose nevyksta numatyta DNR sintezė (paprastai vykstanti ląstelės ciklo S fazės metu). Plačiausiai naudojamas metodas, skirtas šiam įvertinimui, yra tričiu ( $^3\text{H}$ ) žymėto timidino autoradiografija. Atliekant nenumatytos DNR sintezės (NDS) bandymus *in vivo*, daugiausiai naudojamos žiurkių kepenys. Galima naudoti ir kitus audinius nei kepenys, tačiau jie nėra šio metodo objektas.

Nenumatytos DNR sintezės (NDS) nustatymas priklauso nuo pažeidimo vietoje iškirptų ir kitomis pakeistų DNR bazių skaičiaus. Todėl nenumatytos DNR sintezės bandymas ypač vertingas tada, kai siekiama identifikuoti „ilgų fragmentų pažeidimų“ (fragmentų ilgis siekia nuo 20 iki 30 bazių), sukeltų, paveikus bandomąja medžiaga, reparacijas. Tuo tarpu „trumpų fragmentų pažeidimų“ nustatomos, esant daug mažesniam 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. Tai, kad nenumatytos DNR sintezės bandymo metu negaunama specifinės informacijos apie mutageninį aktyvumą, kompensuoja didelis matavimo jautrumas, nes tiriamas visas genomai.

Taip pat žr. Bendrojo įvado B dalį.

## 1.2. APIBRĖŽTYS

**Ląstelės, kuriose vyksta reparacija** – ląstelės, kurių grynasis branduolio granuliu (GBG) skaičius yra didesnis negu pradinė vertė, ir tai patvirtina bandymą atliekanti laboratorija.

**Grynasis branduolio granuliu skaičius (GBG)** – kiekybinis nenumatytos DNR sintezės aktyvumo ląstelėse, atliekant nenumatytos DNR sintezės bandymą autoradiografijos metodu, įvertinimo matas, išreiškiamas iš branduolio granuliu (BG) skaičiaus atimant vidutinį citoplazminių granuliu, esančių nukleoplazminiuose ploteliuose, skaičių (CG):  $\text{GBG} = \text{BG} - \text{CG}$ . GBG nustatomas kiekvienoje ląstelėje ir tada apskaičiuojama kultūroje ar paraleliose kultūrose esančių ląstelių GBG bendra vertė.

**Nenumatyta DNR sintezė (NDS)** – DNR reparacinė sintezė, vykstanti po cheminėmis medžiagomis ar fiziniais veiksniais sukeltos DNR pažeidimo apimto regiono iškirpimo bei pašalinimo.

## 1.3. BANDYMO METODO PRINCIPAS

Tiriant nenumatytą DNR sintezę (NDS) žinduolių kepenų ląstelėse *in vivo*, parodoma, kad reparacinė DNR sintezė vyksta po to, kai cheminėmis medžiagomis ar fiziniais veiksniais sukeltos DNR pažeidimo apimtas regionas iškerpamas ir pašalinamas. Šis bandymas bendru atveju yra pagrįstas  $^3\text{H}$  žymėto timidino įterpimu į kepenų ląstelių, kurios sudaro labai nedidelę ląstelių, esančių ląstelinio ciklo S fazėje, dalį, DNR.  $^3\text{H}$  žymėto timidino transportas į ląstelę vertinamas autoradiografijos metodu, kadangi šis metodas nėra toks jautrus ląstelių, esančių S fazėje, atžvilgiu, kaip scintiliacijos skystyje nustatymo metodas.

## 1.4. BANDYMO METODO APIBŪDINIMAS

1.4.1. **Pasiruošimas**1.4.1.1. *Gyvūnų rūšies pasirinkimas*

Dažniausiai yra naudojamos žiurkės, tačiau gali būti panaudotos ir kitos atitinkamos žinduolių rūšys. Reikėtų naudoti dažniausiai vartojamus jaunų sveikų suaugusių gyvūnų laboratorines veisles. Bandymo pradžioje gyvūnų svorio variacijos turi būti minimalios ir neviršyti  $\pm 20\%$  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 bandomąją grupes. Narvai pastaunami taip, kad būtų kuo labiau sumažintas aplinkos poveikis, susijęs su narvų išdėstymu. Kiekvienas gyvūnas turi savo identifikacijos ženklą. Prieš pradėdant bandymą, gyvūnams leidžiama aklimatizuotis prie laboratorinių sąlygų mažiausiai 5 dienas.

1.4.1.4. *Bandomosios medžiagos paruošimas*

Kietosios bandomosios cheminės medžiagos ištirpinamos arba suspenduojamos atitinkamuose tirpikliuose ar nešikliuose ir prireikus praskiedžiamos prieš duodant gyvūnams. Skystos bandomosios medžiagos dozuojamos iš karto arba prieš tai praskiedžiamos. Naudojami švieži bandomosios medžiagos preparatai, nebent duomenys apie medžiagos stabilumą rodo, kad ją galima laikyti.

1.4.2. **Bandymo sąlygos**1.4.2.1. *Tirpiklis/nešiklis*

Naudojamos tirpiklio ar nešiklio dozės neturėtų kelti jokio toksinio poveikio ir neturėtų kilti spėlionių, kad jis gali chemiškai reaguoti su bandomąja medžiaga. Jeigu naudojami kiti, mažiau žinomi tirpikliai ir (arba) nešikliai, reikia pateikti jų tinkamumą įrodančius duomenis. Jei yra įmanoma, tai pirmiausia rekomenduojama naudoti vandeninį tirpiklį arba nešiklį.

1.4.2.2. *Kontroliniai mėginiai*

Atliekant kiekvieną nepriklausomą eksperimento dalį, vienu metu turi būti naudojami teigiami ir neigiami (tirpiklis/nešiklis) kontroliniai mėginiai. Kontrolinės grupės gyvūnai turi būti laikomi tomis pačiomis sąlygomis kaip ir bandomieji gyvūnai, tik jie neveikiami bandomąja medžiaga.

Teigiami kontroliniai mėginiai turi būti žinomos medžiagos, sukeliančios nenumatytą DNR sintezę, kai jos duodamos tokia doze, kuri, kaip tikimasi, užgoš lengvai nustatomą pašalinį foną. Kai naudojamos vidutinę atsaką sukeliančios dozės, tai reikia naudoti teigiamus kontrolinius mėginius, kuriems yra būtina metabolinė aktyvacija (4). Dozės turi būti taip parenkamos, kad gaunami poveikiai būtų aiškūs, bet tyrėjas negalėtų iškart dešifruoti užkoduotus objektinius stiklelius. Teigiamoms kontrolinėms medžiagoms priklauso:

Mėginių paėmimo laikas	Medžiaga	CAS Nr.	Einecs Nr.
Ankstyvasis mėginių paėmimas (2–4 valandos)	N-nitrozodimetilaminas	62–75–9	200–249–8
Vėlyvasis mėginių paėmimas (12–16 valandų)	N-2-fluorenilacetamidas (2-AAF)	53–96–3	200–188–6

Kitos atitinkamos teigiamos kontrolinės medžiagos irgi gali būti naudojamos. Priimtina, kad teigiama kontrolinė medžiaga duodama kitu būdu nei bandomoji medžiaga.

**1.5. BANDYMO ATLIKIMO METODIKA****1.5.1. Gyvūnų skaičius ir lytis**

Atsižvelgiant į tiriamojo atsako natūraliąją biologinę variaciją, reikia panaudoti tinkamą gyvūnų skaičių. Kiekvienoje grupėje turi būti mažiausiai 3 bandomieji gyvūnai. Jei yra didelė anksčiau atliktų bandymų duomenų bazė, tai vienu metu naudojamose teigiamose ir neigiamose kontrolinėse grupėse turi būti tik po 1 ar 2 gyvūnus.

Jei bandymo metu galima gauti anksčiau atliktų bandymų, kuriems naudota ta pati gyvūnų rūšis ir tas pats veikimo bandomąja medžiaga būdas, duomenų, kurie rodo, kad toksiškumas abiem lytims nelabai skiriasi, užtenka iširti vienos lyties gyvūnus, geriausia patinus. Jeigu žmogaus sąlytis su bandomąja medžiaga priklauso nuo lyties, pvz., kai kurių farmakologiškai aktyvių medžiagų atveju, reikia iširti atitinkamos lyties gyvūną.

**1.5.2. Veikimo tvarkaraštis**

Paprastai bandomosios medžiagos duodamos tik vieną kartą.

**1.5.3. Dozės dydžiai**

Paprastai naudojami 2 dozės dydžiai. Didžiausia doze laikoma dozė, kuri sukelia tokius toksiškumo požymius, kad pagal tą pačią seką duodama didesnė dozė būtų mirtina. Apskritai, žemesnioji dozė turi sudaryti nuo 25 % iki 50 % didesnės dozės.

Medžiagos, pasižyminčios specifiniu biologiniu aktyvumu, kai jų dozės būna mažos ir netoksiškos (pavyzdžiui tokios kaip hormonai ir mitogenai) gali būti laikomos išimtimi, kai joms taikomi 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 veislės ir lyties gyvūnus bei tą patį veikimo būdą kaip ir pagrindinio bandymo metu.

Didžiausia dozė taip pat gali būti apibrėžiama kaip dozė, kurią davus, kepenyse pasireiškia kai kurie toksiškumo požymiai (pavyzdžiui, piknotiniai branduoliai).

**1.5.4. Ribinis bandymas**

Jei atlikus bandymą su bent viena 2 000 mg/kg kūno masės dydžio doze, kuri duota per vieną arba du kartus tą pačią dieną, nepastebima jokio toksinio poveikio bei, remiantis struktūriškai panašių cheminių medžiagų tyrimų duomenimis, genotoksinis poveikis nenumatomas, viso bandymo atlikti gali nereikėti. Atsižvelgiant į numatomą žmogaus sąlytį su medžiaga, gali reikėti atlikti ribinį bandymą su didesne doze.

**1.5.5. Dozių davimas**

Bandomoji medžiaga yra paprastai duodama priverstinai maitinant per vamzdelį, įstatant jį į skrandį, tinkamai įvedant kanulę per vamzdelį. Bandomąją medžiagą galima įvesti ir kitais būdais, jei jie yra pagrindžiami. Tačiau įvedimas į pilvo ertmę nerekomenduojamas, nes bandomoji medžiaga gali tiesiogiai paveikti kepenis per cirkuliacinę sistemą. Maksimalus skysčio, priverstinai duodamo per vamzdelį arba injekuojamo į pilvą vienu metu, tūris priklauso nuo bandomojo gyvūno dydžio. Tūris neturi viršyti 2 ml/100 g kūno masės. Didesnių nei šitų tūrių davimas turi būti pagrindžiamas. Išskyrus dirginančias ar esdinančias medžiagas, kurių didesnės koncentracijos sukelia labai sunkų poveikį, bandomosios medžiagos tūrio kitimas turi būti sumažinamas iki minimumo, koncentraciją taip sureguliuojant, kad esant visiems dozės lygiams, tūris būtų pastovus.

**1.5.6. Kepenų ląstelių paruošimas**

Kepenų ląstelės yra paruošiamos paimant jas iš gyvūnų, paveiktų bandomąja medžiaga, po dozės davimo praėjus 12–16 valandų. Paprastai reikia paimti papildomą mėginį (po veikimo medžiaga praėjus 2–4 valandoms), nebent po 12–16 valandų laikotarpiu buvo gautas aiškus teigiamas atsakas. Tačiau mėginius paimti galima ir kitu metu, kuris pagrindžiamas, remiantis toksikokinetinių bandymų duomenimis.

Perleidžiant kolagenazę per kepenis *in situ* ir sudarant sąlygas naujai disocijavusioms kepenų ląstelėms pačioms prisitvirtinti prie tinkamo paviršiaus, gaunamos žinduolių kepenų ląstelių trumpalaikės kultūros. Neigiamų kontrolinių gyvūnų kepenų ląstelių gyvybingumas mažiausiai turi siekti 50 %.

### 1.5.7. Nenumatytos DNR sintezės (NDS) nustatymas

Šviežiai išskirtos žinduolių kepenų ląstelės paprastai inkubuojamos terpėje, turinčioje  $^3\text{H}$  žymėto timidino atitinkamam laikui (pavyzdžiui, nuo 3 iki 8 valandų). Baigiantis inkubacijai, terpė turi būti atskiriama nuo ląstelių, kurios vėliau gali būti inkubuojamos terpėje, turinčioje nežymėto timidino perteklių tam, kad sumažėtų neįsijungusio timidino radioaktyvumas (vadinamasis „šaltasis persekiojimas“). Po inkubacijos ląstelės plaunamos, fiksuojamos bei džiovinamos. Jei inkubacija užtrunka ilgiau, tai nežymėto timidino perteklius terpėje nėra būtinas. Objektiniai stikleliai pamerkami į autoradiografinę emulsiją, eksponuojami tamsoje (pvz., laikant šaldytuve 7–14 dienų), išryškunami, dažomi ir skaičiuojamos sidabro granulės, sudariusios ekspozicijos metu. Iš kiekvieno gyvūno paimtų mėginių paruošiama nuo 2 iki 3 stiklelių.

### 1.5.8. Analizė

Ląstelės, esančios paruoštuose objektiniuose stikleliuose, turi pasižymėti normaliomis morfologinėmis ypatybėmis tam, kad būtų galima įvertinti svarbią neplanuotą DNR sintezę. Preparatai tiriami mikroskopu, ieškant akivaizdžių toksiškumo požymių (pavyzdžiui, piknotinių branduolių arba sumažėjusio įvestos žymės radioaktyvumo).

Prieš skaičiuojant granules, objektiniai stikleliai užkoduojami. Normaliai kiekvieno gyvūno atveju 2 objektiniuose stikleliuose įvertinama 100 ląstelių. Jei kiekvieno gyvūno atveju įvertinama mažiau nei 100 ląstelių, tai šitai pagrindžiama. Granulės neskaiciuojamos branduoliuose, jei ląstelės yra S fazėje, tačiau reikia nurodyti ląstelių, esančių S fazėje, skaičių.

$^3\text{H}$  žymėto timidino įjungimas į morfologiškai normalių ląstelių branduolius bei citoplazmą, įvertinamas pagal sidabro granulių sankaupas, turi būti tiriamas atitinkamais metodais.

Granulių skaičius yra nustatomas virš branduolio (branduolio granulės, BG) ir nukleoplazminiai ploteliai nustatomai virš citoplazmos (citoplazminės granulės, CG). CG skaičius nustatomas matuojant labiausiai pažymėtą citoplazmos plotą, arba, išvedant dviejų ar trijų atsitiktinių citoplazminių granulių, esančių prie branduolio, skaičiavimų rezultatų vidurkį. Kiti skaičiavimo metodai (pvz. visų ląstelių suskaičiavimas) gali būti naudojami, jei naudojimą galima pagrįsti (6).

## 2. DUOMENYS

### 2.1. REZULTATŲ APDOROJIMAS

Turi būti pateikiami duomenys apie kiekvieną objektinį stiklėlį bei tirtą gyvūną. Be to, visi duomenys pateikiami apibendrintai, lentelių forma. Grynas branduolio granulių (BG) 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 pradėdant bandymą, jie turi būti pasirinkti bei pagrindžiami.

### 2.2. REZULTATŲ ĮVERTINIMAS IR AIŠKINIMAS

Teigiamų/neigiamų atsakų kriterijų pavyzdžiai:

- |          |     |  |
|----------|-----|--|
| teigiami | i)  | GBG vertės yra aukščiau nustatyto slenkstinio lygio, kuris pagrindžiamas, remiantis anksčiau laboratorijoje gautais duomenimis; arba |
|          | ii) | GBG vertės yra žymiai didesnės už kontrolinio mėginio, naudojamo tuo pačiu metu, vertę;  |
| neigiami | i)  | GBG vertės atitinka arba yra mažesnės už anksčiau naudoto kontrolinio mėginio slenkstinį lygį; arba                                  |
|          | ii) | GBG vertės yra nežymiai didesnės už kontrolinio mėginio, naudojamo tuo pačiu metu, vertę.  |

Reikia aptarti duomenų biologinę vertę: atsižvelgiama į tokius parametrus, kaip variacija tarp atskirų gyvūnų, dozės ir atsako tarpusavio ryšys bei citotoksiškumas. Tačiau statistinė svarba neturėtų būti vieninteliu faktoriumi, apsprendžiančiu, ar atsakas teigiamas ar ne.

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

Teigiami rezultatai, gauti tiriant neplanuotą DNR sintezę (NDS) žinduolių kepenų ląstelėse *in vivo*, rodo, kad bandomoji medžiaga sukelia DNR pažaidas žinduolių kepenų ląstelėse *in vivo*, o pažaidų reparacija vyksta neplanuotos DNR sintezės (NDS) metu *in vitro*. Neigiamas rezultatas rodo, kad esant bandymo sąlygoms, bandomoji medžiaga nesukelia DNR pažaidų, nustatomų šiuo bandymu.

Reikia aptarti tą galimybę, ar bandomoji medžiaga ar jos metabolitai pasieks bendrąją apytaką ar tik tikslinį audinį (pvz., sisteminio toksiškumo atveju)

### 3. ATASKAITA

#### BANDYMO ATASKAITA

Bandymo ataskaitoje turi būti pateikiama tokia informacija:

Tirpiklis/nešiklis:

- priežastys, dėl kurių buvo pasirinktas šis nešiklis,
- bandomosios cheminės medžiagos, esančios tirpiklyje/nešiklyje, tirpumas ir stabilumas, jei toks yra žinomas.

Bandomieji gyvūnai:

- panaudota rūšis ar veislė,
- gyvūnų skaičius, amžius ir lytis,
- šaltinis, laikymo sąlygos, maitinimas ir pan.,
- kiekvieno gyvūno svoris prieš pradėdant bandymą ir kiekvienos grupės svorio riba, vidurkiai bei standartinis nukrypimas.

Bandymo sąlygos:

- teigiami ir neigiami (tirpiklis/nešiklis) kontroliniai mėginiai,
- intervalo paieškos bandymo, jei jis buvo vykdomas, duomenys,
- pagrindinė priežastis, nulėmusi dozės dydžio pasirinkimą,
- duomenys apie bandomosios medžiagos paruošimą,
- duomenys apie bandomosios medžiagos davimą,
- pagrindinė priežastis, nulėmusi davimo būdo pasirinkimą,
- metodai, kuriais patvirtinama, kad bandomoji cheminė medžiaga pateko į bendrąją cirkuliaciją ar audinį, į kurį ji buvo nukreipta, jei tai įmanoma nurodyti,
- tikrosios dozės (mg/kg kūno masės/parai) ir bandomosios medžiagos koncentracijos maiste/geriamajame vandenyje (ppm) perskaičiavimo į tikrąją dozę faktorius, jei naudojamas,
- duomenys apie pašarų ir geriamojo vandens kokybę,
- išsamus veikimo bandomąja medžiaga ir mėginio paėmimo tvarkaraščio aprašymas,
- metodai toksiškumui įvertinti,
- kepenų ląstelių paruošimo ir kultivavimo metodai,
- panaudotas autoradiografinis metodas,

- paruoštų objektinių stiklelių ir įvertintų ląstelių skaičius,
- įvertinimo kriterijai,
- teigiamų, neigiamų ar abejotinų bandymo rezultatų nustatymo kriterijai.

Rezultatai:

- kiekvieno objektinio stiklelio, gyvūno ir gyvūnų grupės branduolio granulių, citoplazminių granulių ir grynojo branduolio granulių skaičiaus vidutinės vertės,
- dozės ir atsako tarpusavio ryšys, jei tai įmanoma nurodyti,
- statistinės analizės, jei bet kokios buvo atliktos,
- toksiškumo požymiai,
- duomenys apie tuo pačiu metu naudotus neigiamus (tirpiklis/nešiklis) ir teigiamus kontrolinius mėginius,
- anksčiau gauti duomenys apie neigiamus kontrolinius mėginius, nurodant intervalus, vidurkius ir standartinius nukrypimus,
- „ląstelių, kuriose vyksta reparacija“, skaičius, jeigu jis buvo nustatytas,
- ląstelių, esančių S fazėje skaičius, jeigu jis buvo nustatytas,
- ląstelių gyvybingumas.

Rezultatų aptarimas.

Išvados.

#### 4. NUORODOS

- 1) Ashby, J., Lefevre, P.A., Burlinson, B. and Penman, M.G. (1985). An Assessment of the *In Vivo* Rat Hepatocyte DNA Repair Assay. *Mutation Res.*, 156, p. 1–18.
- 2) Butterworth, B.E., Ashby, J., Bermudez, E., Casciano, D., Mirsalis, J., Probst, G. and Williams, G. (1987). A Protocol and Guide for the *In Vivo* Rat Hepatocyte DNA-Repair Assay. *Mutation Res.* 189, p. 123–133.
- 3) Kennelly, J.C., Waters, R., Ashby, J., Lefevre, P.A., Burlinson, B., Benford, D.J., Dean, S.W. and Mitchell, I. de G. (1993). *In Vivo* Rat Liver UDS Assay. In: Kirkland D.J. and Fox M., (Eds) Supplementary Mutagenicity Tests: UKEM Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part II revised. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, p. 52–77.
- 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.40. ODOS SUARDYMAS *IN VITRO*. ODOS SLUOKSNIO ELEKTRINĖS VARŽOS (OSEV) BANDYMAS

## 1. METODAS

Šis bandymo metodas atitinka OECD TG 430 (2004).

## 1.1. ĮVADAS

Odos suardymu vadinamas negrįžtamas odos audinių pažeidimas po bandomosios medžiagos uždėjimo [kaip apibrėžta pagal Visuotinai suderintą cheminių medžiagų ir mišinių klasifikavimo sistemą (*Globally Harmonised Classification System for Chemical Substances and Mixtures- GHS*)] (1). Odos suardomumui įvertinti pagal šį metodą nenaudojami gyvi gyvūnai.

Odos suardomumas paprastai buvo įvertinamas naudojant laboratorinius gyvūnus (2). Peržiūrint B.4 bandymo metodą atsižvelgta į gyvūnams sukeliamas kančias ir skausmą, ir metodas pakoreguotas numatant *in vitro* metodus, taip gyvūnams nesukeliant skausmo ir kančių.

Pirmasis žingsnis reguliavimo tikslais apibrėžiant alternatyvius bandymus, kurie gali būti naudojami odos suardomumui bandyti, buvo pradiniai tinkamumo patvirtinimo bandymai (3). Vėliau buvo atliekamas oficialus odos suardymui įvertinti skirtų *in vitro* metodų (4)(5) tinkamumo patvirtinimas (6)(7)(8). Pagal šių bandymų rezultatus ir kitus paskelbtus duomenis (9), buvo pateikta rekomendacija, pagal kurią *in vitro* odos suardomumui įvertinti galėtų būti taikomi šie bandymai (9)(10)(11): žmogaus odos modelio bandymas (žr. B. 40bis bandymo metodą) ir odos sluoksnio elektrinės varžos bandymas (šis metodas).

Tinkamumo patvirtinimo ir kituose paskelbtuose bandymuose teigiama, kad žiurkių odos sluoksnio varžos (OSEV) bandymu (12)(13) galima patikimai atskirti žinomas odą suardančias ir odos nesuardančias medžiagas (5)(9).

Naudojant šiame metode aprašytą bandymą, galima nustatyti ardančias chemines medžiagas ir mišinius. Be to, galima nustatyti neardančias medžiagas ir mišinius, jei rezultatams patvirtinti išanalizuojama kita turima informacija (pvz., pH, struktūros ir aktyvumo santykių, žmonėms ir (arba) gyvūnams gautų duomenų) įrodomoji vertė (1)(2)(11)(14). Paprastai šiuo bandymu negaunama informacijos apie odos dirginimą ir nėra galimybės ardančias medžiagas suskirstyti į kategorijas, kaip tai leidžia daryti Visuotinai suderinta klasifikavimo sistema (GHS) (1).

Norint visiškai įvertinti vienkartinio odos veikimo vietinį poveikį odai, rekomenduojama taikyti nuosekliųjų bandymų strategiją, kuri pridedama prie B.4 bandymo metodo (2) ir numatyta Visuotinai suderintoje sistemoje (GHS) (1). Šią bandymo strategiją sudaro odos suardymo *in vitro* bandymai (kaip aprašyta šiame metode) ir odos dirginimo bandymai prieš sprendžiant klausimą dėl bandymų su gyvais gyvūnais.

## 1.2. APIBRĖŽTYS

**Odos suardymas *in vivo*:** negrįžtamas odos pažeidimas; būtent, matomoji nekrozė per epidermį ir odos nekrozė po bandomosios medžiagos uždėjimo ne ilgiau kaip keturioms valandoms. Odos suardymo požymiai yra opos, kraujavimas, kruvini šašai ir, baigiantis 14 parų stebėjimo laikotarpiui, odos blukimas dėl jos išbalimo, visiškai nuplikusios vietos ir randai. Neaiškiems pažeidimams nustatyti reikėtų atlikti histopatologinį tyrimą.

**Odos sluoksnio elektrinė varža (OSEV):** pilnutinės odos elektrinės varžos matas, išreikštas varžos verte kiloomais. Paprastas ir patikimas metodas užtvaro funkcijai įvertinti, registruojant jonų praėjimą per odos sluoksnį Vitstono tiltelio aparato pagalba.

## 1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

1 lentelė

## Etaloninės cheminės medžiagos

Pavadinimas	Einecs Nr.	CAS Nr.	
1,2-diaminopropanas	201-155-9	78-90-0	Labai ardanti

Pavadinimas	Einecs Nr.	CAS Nr.	
Akriilo rūgštis	201-177-9	79-10-7	Labai ardanti
2-tret-butilfenolis	201-807-2	88-18-6	Ardanti
Kalio hidroksidas (10 %)	215-181-3	1310-58-3	Ardanti
Sieros rūgštis (10 %)	231-639-5	7664-93-9	Ardanti
Oktano rūgštis (kaprilo rūgštis)	204-677-5	124-07-02	Ardanti
4-amino-1,2,4-triazolas	209-533-5	584-13-4	Neardanti
Eugenolis	202-589-1	97-53-0	Neardanti
Fenetilbromidas	203-130-8	103-63-9	Neardanti
Tetrachloretilenas	204-825-9	27-18-4	Neardanti
Izostearino rūgštis	250-178-0	30399-84-9	Neardanti
4-(metiltio)-benzaldehydas	222-365-7	3446-89-7	Neardanti

Didesnė dalis išvardytų medžiagų yra paimta iš ECVAM tarptautiniam tinkamumo patvirtinimo bandymui (4) atrinktų cheminių medžiagų sąrašo. Jų atranka pagrįsta šiais kriterijais:

- i) vienodas ardančių ir neardančių medžiagų skaičius;
- ii) naudojamos prekyboje esančios medžiagos, kurios priklauso didesnei atitinkamų cheminių junginių klasių daliai;
- iii) įtrauktos labai ardančios ir mažiau ardančios medžiagos, siekiant nustatyti ardomojo poveikio stiprumu pagrįstus skirtumus;
- iv) pasirinktos cheminės medžiagos, su kuriomis būtų galima dirbti laboratorijoje, nesukeliant kitų rimtų, išskyrus odos suardymą, pavojų.

#### 1.4.

#### BANDYMO METODO PRINCIPAS

Bandomoji medžiaga uždedama ant odos diskų epidermio paviršiaus ne ilgiau kaip 24 h, kai diskai yra įdėti į dviejų kamerų bandymo sistemą, kurioje odos diskai šias kameras skiria. Imami humaniškai numarintų 28–30 parų amžiaus žiurkių odos diskai. Ardančios medžiagos nustatomos pagal jų gebą paveikti normalaus *stratum corneum* vientisumą ir užtvaro funkciją, kuri matuojama kaip OSEV sumažėjimas mažiau ribinės vertės (12). Nustatant žiurkių OSEV, buvo pasirinkta ribinė 5 κΩ vertė, pagrįsta dideliu kiekiu duomenų apie labai įvairias chemines medžiagas, pagal kuriuos didžioji dauguma verčių buvo aiškiai didesnės (dažnai > 10 κΩ) arba gerokai mažesnės (dažnai < 3 κΩ) 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 κΩ, 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.

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* atsigauja po plaukų kirpimo.

**1.5.2. Odos diskų paruošimas**

Gyvūnai humaniškai numarunami, 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 laikyti ir panaudoti vėliau, jei įrodoma, kad teigiamų ir neigiamų kontrolinių bandymų duomenys atitinka duomenis, gautus su ką tik paruošta oda.

Kiekvienas odos diskas dedamas ant vieno PTFE (politetrafluoretileno) vamzdelio galo, užtikrinant, kad epidermio paviršius liestųsi su vamzdeliu. Ant vamzdelio galo užspaudžiamas žiedinis tarpiklis odos žiedui nejudamai laikyti, o audinio perteklius apkarpoamas. Vamzdelio ir žiedinio tarpiklio matmenys pateikti 2 paveiksle. Žiedinis tarpiklis ir PTFE vamzdelis kruopščiai užsandarinami vazelinu. Spyruokliniu spaustuku vamzdelis tvirtinamas rinktuvo kameroje su  $MgSO_4$  tirpalu (154 mmol/l) (1 paveikslas). Odos diskas turi būti visiškai panardintas į  $MgSO_4$  tirpalą. Iš vienos žiurkės odos galima pagaminti 10–15 odos diskų.

Prieš pradėdant bandymą matuojama dviejų odos diskų elektrinė varža, kaip kiekvieno gyvūno odos kokybės kontrolės procedūros dalis. Abiejų diskų varža turi būti didesnė kaip 10  $\kappa\Omega$ , kad likusius diskus būtų galima naudoti bandymui. Jei varžos vertė yra mažesnė kaip 10  $\kappa\Omega$ , 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  $\mu$ l) 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  $\mu$ l) ir vamzdelis nespriptai pakratomas. Siekiant pasiekti didžiausią įmanomą sąlytį su oda, kietas medžiagas gali tekti pašildyti iki 30  $^{\circ}C$ , kad bandomoji medžiaga išsilydytų arba suminkštėtų, arba sumalti į granules arba miltelius.

Kiekvienai bandomajai ir kontrolinei medžiagai naudojami trys odos diskai. Bandomoji medžiaga uždedama 24 h esant 20–23  $^{\circ}C$ . Bandomoji medžiaga pašalinama plaunant ją ne didesnės kaip 30  $^{\circ}C$  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  $\kappa\Omega$  matavimo intervalas. Tinkamumo patvirtinimo matavimams naudojamas tiltelis matuoja induktyvumą, talpą ir varžą iki 2 000 h, 2 000  $\mu$ F ir 2 M $\Omega$ , esant 100 Hz arba 1 kHz dažniui, ir naudojant nuoseklaus arba lygiagretaus jungimo vertes. Atliekant suardomumo bandymo OSEV matavimus, užrašoma varža, esant 100 Hz dažniui ir naudojant nuoseklaus jungimo vertes. Prieš matuojant elektrinę varžą odos paviršiaus įtemptis sumažinama įpilant epidermiui padengti pakankamą tūrį 70 % etanolio. Po kelių sekundžių etanolis iš vamzdelio pašalinamas ir audinys drėkinamas įpilant 3 ml  $MgSO_4$  tirpalo (154 mmol/l). Tiltelio elektrodai dedami iš abiejų odos disko pusių jo varžai  $\kappa\Omega$  išmatuoti (1 paveikslas). Elektrodų matmenys ir elektrodų ilgai žemiau dantytų spaustukų pateikti 2 paveiksle. Spaustukas, prijungtas prie vidinio elektrodo, matuojant varžą remiasi į PTFE vamzdelio viršų, siekiant užtikrinti, kad reikiama elektrodo dalis būtų įmerkta į  $MgSO_4$  tirpalą. Išorinis elektrodas įstatomas į rinktuvo kamerą taip, kad jis remtųsi į kameros dugną. Užtikrinamas nekintamas

atstumas tarp spyruoklinio spaustuko ir PTFE vamzdelio dugno (2 paveikslas), kadangi šis atstumas turi įtakos gautai varžos vertei. Dėl tos pačios priežasties atstumas tarp vidinio elektrodo ir odos disko turi būti pastovus ir kiek įmanoma mažesnis (1–2 mm).

Jei išmatuota varžos vertė yra didesnė kaip 20  $\kappa\Omega$ , 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;  $MgSO_4$  tirpalas išpilamas ir varža dar kartą matuojama, įpylus naujo  $MgSO_4$  tirpalo.

Bandymo aparato savybės bei matmenys ir taikoma matavimo procedūra gali turėti įtakos gautoms OSEV vertėms. 5  $\kappa\Omega$  ardymo ribinė vertė buvo nustatyta pagal duomenis, gautus naudojant šiame metode aprašytą konkretų aparatą ir procedūrą. Gali būti taikomos kitos ribinės ir kontrolinės vertės, jei pakinta bandymo sąlygos arba naudojamas kitas aparatas. Taigi metodą ir varžos ribines vertes būtina kalibruoti, bandant eilę etalonų, pasirinktų iš tinkamumo patvirtinimo bandyme naudotų cheminių medžiagų (4) (5), arba iš medžiagų, kurių klasė atitinka bandomų cheminių medžiagų klasę. Tinkamų etaloninių cheminių medžiagų rinkinys pateiktas 1 lentelėje.

#### 1.5.5. Dažiklio surišimo metodai

Veikiant tam tikroms neardančioms medžiagoms varža gali sumažėti iki mažesnės kaip ribinė 5  $\kappa\Omega$  vertė, todėl jona 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  $\kappa\Omega$  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 ekstrakcija procedūra.

##### 1.5.5.1. Sulforodamino B dažiklio uždėjimas ir pašalinimas

Po OSEV įvertinimo magnio sulfatas išpilamas iš vamzdelio ir oda kruopščiai apžiūrinama, 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  $\mu$ 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 dodecilsulfato tirpalu distiliuotame vandenyje. Tirpalo optinis tankis matuojamas esant 565 nm bangos ilgiui.

##### 1.5.5.2. Dažiklio kiekio apskaičiavimas

Sulforodamino B dažiklio kiekis vienam diskui apskaičiuojamas pagal optinio tankio vertes (5) (sulforodamino B dažiklio molinis ekstinkcijos koeficientas =  $8,7 \times 10^4$ , 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 ( $\kappa\Omega$ ) ir vidutinės dažiklio kiekio vertės ( $\mu$ g/diskui), jei tinka, pateikiamos lentelėse (atskirų bandymų duomenys ir vidutinė vertė  $\pm$  standartinis nuokrypis), įskaitant lygiagrečių/kartotinių bandymų rezultatus, vidurkius ir atskiras vertes.

## 2.1. REZULTATŲ AIŠKINIMAS

Vidutiniai OSEV rezultatai yra priimtini, jei bandymo laboratorijoje lygiagrečiai atliekamų teigiamų ir neigiamų kontrolinių bandymų vertės patenka į metodui priimtinus intervalus. Priimtini varžos intervalai, taikant pirmiau aprašytą metodą ir aparatūrą, pateikti šioje lentelėje:

Kontrolinis bandymas	Medžiaga	Varžos intervalas ( $\kappa\Omega$ )
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 ( $\mu\text{g}/\text{diskas}$ )
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  $\kappa\Omega$ , arba
- ii) OSEV vidutinė vertė yra lygi 5  $\kappa\Omega$  arba mažesnė kaip 5  $\kappa\Omega$ , 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  $\kappa\Omega$  arba mažesnis kaip 5  $\kappa\Omega$ , ir odos diskas yra akivaizdžiai pažeistas, arba
- ii) OSEV vidurkis yra lygus 5  $\kappa\Omega$  arba mažesnis kaip 5  $\kappa\Omega$ , 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.

## 3. ATASKAITOS PATEIKIMAS

## 3.1. BANDYMO ATASKAITA

Bandymo ataskaitoje turi būti pateikta tokia informacija:

Bandomoji ir kontrolinė medžiagos:

- cheminis (-iai) pavadinimas (-ai), pvz., IUPAC arba CAS pavadinimas, ir CAS numeris, jei žinomas,
- medžiagos arba preparato grynumas ir sudėtis (masės procentine (-ėmis) dalimi (-is), fizinė prigimtis,

- fizikinės ir cheminės savybės, pvz., fizikinė būseną, pH, stabilumas, tirpumas vandenyje, svarbios atliekamam bandymui,
- bandomosios ir(arba) kontrolinės medžiagų apdorojimas prieš bandymą, jei taikomas (pvz., šildymas, malimas),
- stabilumas, jei žinomas.

Bandomieji gyvūnai:

- naudota rūšis ir lytis,
- gyvūnų amžius, kai paimama jų oda,
- šaltinis, laikymo sąlygos, šėrimas ir t.t.,
- išsami informacija apie odos paruošimą.

Bandymo sąlygos:

- bandymo aparato kalibravimo kreivės,
- kalibravimo kreivės, skirtos dažiklio surišimo bandymui,
- OSEV matavimams naudojama išsami informacija apie bandymų procedūrą,
- dažiklio surišimo įvertinimui naudojama išsami informacija apie bandymų procedūrą; jei taikoma,
- visų bandymo procedūrų pakeitimų aprašymas,
- taikytų vertinimo kriterijų aprašymas.

Rezultatai:

- lentelėse pateikti OSEV ir dažiklio surišimo bandymo (jei taikoma) duomenys pagal atskirus gyvūnus ir atskirus odos bandinius,
- visų pastebėtų reiškinių aprašymas.

Rezultatų aptarimas.

Išvados.

4.

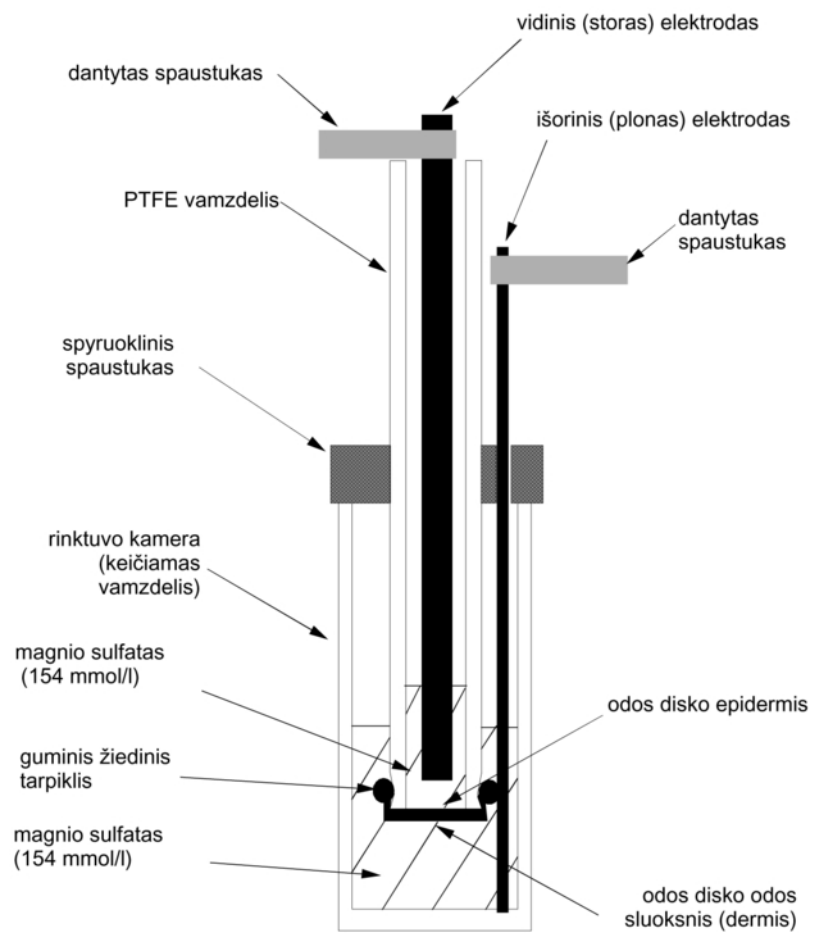
**NUORODOS**

- 1) OECD (2001) Harmonised Integrated Classification System for Human Health and Environmental Hazards of Chemical Substances and Mixtures. OECD Series on Testing and Assessment Number 33. ENV/JM/MONO(2001)6, Paris. [http://www.olis.oecd.org/olis/2001doc.nsf/LinkTo/env-jm-mono\(2001\)6](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 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](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.
- 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 interlaboratory 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.

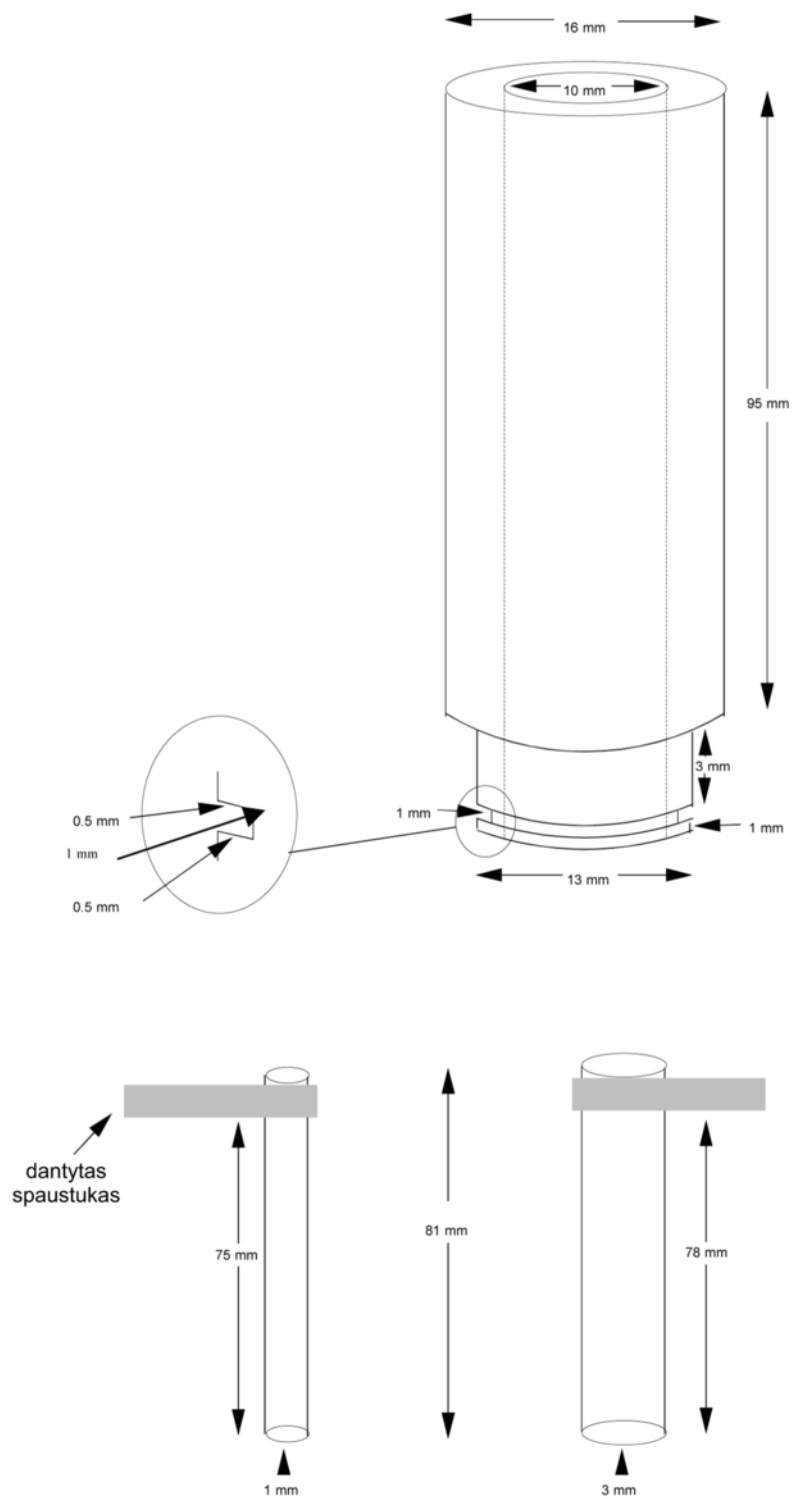
## 1 paveikslas

## Žiurkių odos OSEV bandymo aparatas



## 2 paveikslas

## Politetrafluoretileno (PFTE) ir rinktuvo vamzdelių bei naudojamų elektrodų matmenys



**Viršuje pavaizduoto aparato svarbiausi parametrai:**

- PTFE vamzdelio vidinis skersmuo,
- elektrodų ir PTFE bei rinktuvo vamzdelių ilgio santykis turi būti toks, kad elektrodai nelieštų odos disko ir standartinio ilgio elektrodo atkarpa būtų panardinta į  $\text{MgSO}_4$  tirpalą,
- $\text{MgSO}_4$  tirpalo tūris rinktuvo vamzdelyje turi užtikrinti 1 paveiksle parodytą skysčio lygį 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.40 bis. **ODOS SUARDYMAS *IN VITRO*. ŽMOGAUS ODOS MODELIO BANDYMAS**1. **METODAS**

Šis bandymo metodas atitinka OECD TG 431 (2004).

## 1.1. ĮVADAS

Odos suardymu vadinamas negrįžtamas odos audinių pažeidimas po bandomosios medžiagos uždėjimo [kaip apibrėžta pagal Visuotinai suderintą cheminių medžiagų ir mišinių klasifikavimo sistemą (*Globally Harmonised Classification System for Chemical Substances and Mixtures*– GHS)] (1). Odos suardomumui įvertinti pagal šį metodą nenaudojami gyvi gyvūnai arba jų audiniai.

Odos suardomumas paprastai buvo įvertinamas naudojant laboratorinius gyvūnus (2). Peržiūrint B.4 bandymo metodą atsižvelgta į gyvūnams sukeliamas kančias ir skausmą, ir metodas pakoreguotas numatant *in vitro* metodus, taip gyvūnams nesukeliant skausmo ir kančių.

Pirmasis žingsnis reguliavimo tikslais apibrėžiant alternatyvius bandymus, kurie gali būti naudojami odos suardomumui bandyti, buvo pradiniai tinkamumo patvirtinimo bandymai (3). Vėliau buvo atliekamas oficialus odos suardymui įvertinti skirtų *in vitro* metodų (4) (5) tinkamumo patvirtinimas (6) (7) (8). Pagal šių bandymų rezultatus ir kitus paskelbtus duomenis (9), buvo pateikta rekomendacija, pagal kurią *in vitro* odos suardomumui įvertinti galėtų būti taikomi šie bandymai (10) (11) (12) (13): žmogaus odos modelio bandymas (šis metodas) ir odos sluoksnio elektrinės varžos bandymas (žr. B.40 bandymo metodą).

Tinkamumo patvirtinimo bandymų metu gauta duomenų, kad bandymais, kuriuose naudojami žmogaus odos modeliai (3) (4) (5) (9), galima patikimai atskirti žinomas odą suardančias ir odos nesuardančias medžiagas. Be to, pagal bandymo protokolą galima gauti smarkiai odą suardančių ir mažiau suardančių medžiagų skirtumo rodmenį.

Naudojant šiame metode aprašytą bandymą, galima nustatyti ardančias chemines medžiagas ir mišinius. Be to, galima nustatyti neardančias medžiagas ir mišinius, jei rezultatams patvirtinti išanalizuojama kita turima informacija (pvz., pH, struktūros ir aktyvumo santykių, žmonėms ir (arba) gyvūnams gautų duomenų įrodomoji vertė (1) (2) (13) (14)). Paprastai šiuo bandymu negaunama reikiamos informacijos apie odos dirginimą ir nėra galimybės ardančias medžiagas suskirstyti į kategorijas, kaip tai leidžia daryti Visuotinai suderinta klasifikavimo sistema (GHS) (1).

Norint visapusiškai įvertinti vienkartinio odos veikimo vietinį poveikį odai, rekomenduojama taikyti nuosekliųjų bandymų strategiją, kuri pridedama prie B.4 bandymo metodo (2) ir numatyta Visuotinai suderintoje klasifikavimo sistemoje (GHS) (1). Šią bandymo strategiją sudaro odos suardymo *in vitro* bandymai (kaip aprašyta šiame metode) ir odos dirginimo bandymai prieš sprendžiant klausimą dėl bandymų su gyvais gyvūnais.

## 1.2. APIBRĖŽTYS

**Odos suardymas *in vivo*** – negrįžtamas odos pažeidimas; būtent, matoma epidermio ir tikrosios odos (dermio) nekrozė praėjus ne daugiau kaip keturioms valandoms po bandomosios medžiagos uždėjimo. Tipiniai suardymo požymiai: opos, kraujavimas, kruvini šašai ir, baigiantis 14 parų stebėjimo laikotarpiui, odos blukimas dėl jos išbalimo, visiškai nuplikusios vietos ir randai. Neaiškūs pažeidimai turėtų būti vertinami pasitelkiant histopatologinį tyrimą.

**Ląstelių gyvybingumas** – parametras suminiam ląstelių populiacijos aktyvumui matuoti (pvz., ląstelių mitochondrinių dehidrogenazių geba redukuoti vitalinį dažiklį MTT), kuris, atsižvelgiant į galutinį matuojamą dydį ir taikomą bandymo schemą, yra susijęs su suminiu ląstelių kiekiu ir (arba) jų gyvybingumu.

## 1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

1 lentelė

**Etaloninės cheminės medžiagos**

Pavadinimas	Einecs Nr.	CAS Nr.	
1,2-diaminopropanas	201–155–9	78–90–0	Labai ardanti

Pavadinimas	Einecs Nr.	CAS Nr.	
Akriilo rūgštis	201-177-9	79-10-7	Labai ardanti
2-tret-butilfenolis	201-807-2	88-18-6	Ardanti
Kalio hidroksidas (10 %)	215-181-3	1310-58-3	Ardanti
Sieros rūgštis (10 %)	231-639-5	7664-93-9	Ardanti
Oktano rūgštis (kaprilo rūgštis)	204-677-5	124-07-02	Ardanti
4-amino-1,2,4-triazolas	209-533-5	584-13-4	Neardanti
Eugenolis	202-589-1	97-53-0	Neardanti
Fenetilbromidas	203-130-8	103-63-9	Neardanti
Tetrachloretilenas	204-825-9	27-18-4	Neardanti
Izostearino rūgštis	250-178-0	30399-84-9	Neardanti
4-(metiltio)-benzaldehydas	222-365-7	3446-89-7	Neardanti

Didesnė išvardytų medžiagų dalis yra įtraukta į ECVAM tarptautiniam tinkamumo patvirtinimo bandymui (4) atrinktų cheminių medžiagų sąrašą. Jų atranka pagrįsta šiais kriterijais:

- i) vienodas ardančių ir neardančių medžiagų skaičius;
- ii) naudojamos prekyboje esančios medžiagos, kurios priklauso didesnei atitinkamų cheminių junginių klasių daliai;
- iii) siekiant nustatyti ardomojo poveikio stiprumu pagrįstus skirtumus, įtrauktos labai ardančios ir mažiau ardančios medžiagos;
- iv) pasirinktos tokios cheminės medžiagos, su kuriomis būtų galima dirbti laboratorijoje nesukeliant kitų rimtų, išskyrus odos suardymą, pavojų.

#### 1.4. BANDYMO METODO PRINCIPAS

Bandomoji cheminė medžiaga uždedama ant trijų matmenų žmogaus odos modelio, kurį sudaro bent jau rekonstruotas epidermis ir funkcionalus *stratum corneum*. Ardančios medžiagos nustatomos pagal jų sugebėjimą po tam tikro veikimo laikotarpio sumažinti ląstelių gyvybingumą [nustatomą, pvz., taikant MTT redukavimo bandymą (15)] iki lygio, kuris būtų mažesnis už apibrėžtą ribinį lygį. Žmogaus odos modelio bandymas pagrįstas hipoteze, kad ardančios cheminės medžiagos gali prasiskverbti per *stratum corneum* difuzijos arba suardymo būdu ir yra citotoksiškos po juo esančių sluoksnių ląstelėms.

#### 1.4.1. Bandyimo eiga

##### 1.4.1.1. Žmogaus odos modeliai

Žmogaus odos modelius galima pasigaminti arba pirkti (pvz., EpiDerm<sup>TM</sup> ir EPISKIN<sup>TM</sup> modelius) (16) (17) (18) (19) arba sukurti ar pasigaminti bandymų laboratorijoje (20) (21). Pripažįstama, kad naudojant žmogaus odą būtina atsižvelgti į nacionalinius ir tarptautinius etinius aspektus bei sąlygas. Turi būti patvirtintas visų naujų modelių tinkamumas (bent tokiu mastu, kuris aprašytas 1.4.1.1.2). Šiam bandymui naudojami žmogaus odos modeliai turi atitikti šias sąlygas:

##### 1.4.1.1.1. Bendrosios modeliui taikomos sąlygos

Epiteliui sukurti turi būti naudojami žmogaus keratinocitai. Po funkcionalių *stratum corneum* turi būti daugybinių gyvybingų epitelio ląstelių sluoksniai. Be to, odos modelis gali turėti stromos komponentų sluoksnį. *Stratum corneum* turi būti daugiasluoksnis ir turėti būtinąjį riebalinį profilį, kad susidarytų pakankamai tvirtas funkcionalus užtvaras, per kurį negalėtų greitai prasiskverbti citotoksiniai markeriai. Modelio sulaukusios savybės turi neleisti medžiagai apeiti *stratum corneum* ir patekti į gyvybingąjį audinį. Jei bandomosios medžiagos galėtų apeiti *stratum corneum*, odos veikimo medžiaga modeliavimas būtų netinkamas. Odos modelis neturi būti užterštas bakterijomis (įskaitant mikoplazmą) arba grybeliais.

##### 1.4.1.1.2. Funkcinės modeliui taikomos sąlygos

Gyvybingumas paprastai kiekybiškai įvertinamas naudojant MTT arba kitus medžiagų apykaitoje dalyvaujančius vitalinius dažiklius. Šiais atvejais iš neigiamo kontrolinio bandinio audinio ekstrahuoto (ištirpinto) dažiklio optinis tankis turi būti bent 20 kartų didesnis už vien tik ekstrahavimo tirpiklio optinį tankį [apžvalga pateikta (22)]. Neigiamo kontrolinio bandinio audinys turi būti patvarus kultūroje (užtikrinti panašius gyvybingumo matavimus) visą bandomojo veikimo trukmę. *Stratum corneum* turi būti pakankamai tvirtas, kad galėtų atsispirti greitai cheminių citotoksinių markerių (pvz., 1 % Triton X-100) skverbčiai. Šią savybę galima įvertinti veikimo trukme, per kurią ląstelių gyvybingumas sumažėja 50 % (ET<sub>50</sub>) (pvz., EpiDerm<sup>TM</sup> ir EPISKIN<sup>TM</sup> modeliams šis laikas > 2 h). Turi būti aišku, kad audinys geba atsikurti laikui bėgant, ir, pageidautina, skirtingose laboratorijose. Be to, jis turi padėti nustatyti etaloninių cheminių medžiagų ardomojo poveikio stiprumą (žr. 1 lentelę), kai tokios medžiagos naudojamos pagal pasirinktą bandymo protokolą.

##### 1.4.1.2. Bandomosios ir kontrolinės medžiagų uždėjimas

Kiekvienam apdorojimui (veikimo trukmei) naudojami du kartotiniai audinio bandiniai, įskaitant kontrolinius bandinius. Tiriant skystąsias medžiagas, naudojamos bandomosios medžiagos kiekio turi pakakti tolygiam odos paviršiaus padengimui medžiaga, kurios reikėtų naudoti ne mažiau kaip 25 µL/cm<sup>2</sup>. Jei bandomos kietosios medžiagos, turi būti uždedamas pakankamas medžiagos kiekis odos paviršiui tolygiai uždengti, ją reikėtų sudrėkinti dejonizuotu arba distiliuotu vandeniu geram sąlyčiui su oda užtikrinti. Prireikus kietosios medžiagos prieš naudojimą sumalamos į miltelius. Paviršiaus padengimo metodas turi būti tinkamas bandomajai medžiagai (žr. pvz., 5 nuorodą). Pasibaigus veikimo laikotarpiui, bandomoji medžiaga turi būti kruopščiai nuplauta nuo odos paviršiaus su atitinkamu buferiniu tirpalu arba 0,9 % NaCl.

Norint užtikrinti adekvačias eksperimentinio modelio charakteristikas, kiekvienam bandymui naudojami lygiagretūs teigiami ir neigiami kontroliniai bandiniai. Rekomenduojamos teigiamų kontrolinių bandinių medžiagos yra ledinė acto rūgštis arba 8 mol/l KOH. Rekomenduojamos neigiamų kontrolinių bandinių medžiagos yra 0,9 % NaCl arba vanduo.

##### 1.4.1.3. Ląstelių gyvybingumo matavimai

Ląstelių gyvybingumas matuojamas tik naudojantis patvirtintais kiekybiniais metodais. Be to, naudojamas gyvybingumo matavimo metodas turi tikti naudojami 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.

### 2.1. REZULTATŲ AIŠKINIMAS

Kiekvieno bandomojo bandinio gautos optinio tankio vertės gali būti naudojamos nustatant gyvybingumo procentinę dalį lyginant su neigiamais kontroliniais bandiniais, kurių gyvybingumo vertė pagal susitarimą prilyginama 100 %. Ribinė ląstelių gyvybingumo procentinės dalies vertė, skirianti ardančias ir neardančias bandomąsias medžiagas (arba skirtingas ar suardymo savybių klases), arba statistinė (-ės) procedūra (-os), taikyta (-os) rezultatams įvertinti ir ardančioms medžiagoms nustatyti, turi būti aiškiai apibrėžtos ir patvirtintos dokumentais, be to turi būti įrodytas jų tinkamumas. Apskritai, šios ribinės vertės yra nustatytos optimizuojant bandymą, patikrintos pradinio tinkamumo patvirtinimo etapu ir patvirtintos atliekant tinkamumo patvirtinimo bandymą. Kaip pavyzdys, pateikiama suardymo savybių prognozė, taikant Epi-Derm™ modelį (9):

laikoma, kad bandomoji medžiaga suardo odą:

- i) jei po 3 min. veikimo odos gyvybingumas yra mažesnis kaip 50 %, arba
- ii) jei po 3 min. veikimo gyvybingumas yra lygus 50 % arba didesnis, bet po 1 h veikimo gyvybingumas yra mažesnis kaip 15 %.

Laikoma, kad bandomoji medžiaga neardo odos:

- i) jei po 3 min. veikimo gyvybingumas yra lygus 50 % arba didesnis ir po 1 h veikimo gyvybingumas yra lygus 15 % arba didesnis.

## 3. ATASKAITOS PATEIKIMAS

### 3.1. BANDYMO ATASKAITA

Bandyto ataskaitoje turi būti ši informacija:

bandomoji ir kontrolinė medžiagos:

- cheminis (-iai) pavadinimas (-ai), pvz., IUPAC arba CAS pavadinimas, CAS numeris, jei žinomas;
- medžiagos arba preparato grynumas ir sudėtis (masės procentinė (-ės) dalis (-ys));
- fizikinės ir cheminės savybės, pvz., fizikinė 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.

Bandyto sąlygos:

- naudota ląstelių sistema;
- informacija apie matavimo prietaisą (pvz., spektrofotometro), naudoto ląstelių gyvybingumui matuoti, kalibravimą;
- visa konkretų odos modelį patvirtinanti informacija, įskaitant jo tinkamumą;

- išsami informacija apie taikytą bandymo procedūrą;
- naudotos bandomosios dozės;
- visų bandymo procedūros pakeitimų aprašymas;
- nuoroda į anksčiau gautus duomenis apie modelį;
- taikytų vertinimo kriterijų aprašymas.

#### Rezultatai:

- atskirų bandinių duomenys, suvesti į lenteles;
- kitų pastebėtų reiškinų 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>.
- 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](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. *Cytotechnology* 9, p. 163–171.
- 21) Wilkins, L.M., Watson, S.R., Prosky, S.J., Meunier, S.F., Parentau, N.L. (1994). Development of a bilayered living skin construct for clinical applications. *Biotechnology and Bioengineering* 43/8, p. 747–756.
- 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. In Vitro* 15, p. 57–93.

## B.41. 3T3 NRU FOTOKSIŠKUMO IN VITRO BANDYMAS

## 1. METODAS

Šis metodas atitinka OECD TG 432 (2004).

## 1.1. ĮVADAS

Fototoksiškumas apibrėžiamas kaip toksinis atsakas į ant kūno uždėtą medžiagą, kuris atsiranda arba padidėja (tampa matomas esant mažesnėms dozėms) po to paveikus šviesa, arba kuris sukiamas sisteminiu būdu davus medžiagos ir po to apšvietus odą.

3T3 NRU fototoksiškumo *in vitro* bandymas naudojamas bandomosios medžiagos fototoksiniam potencialui nustatyti, kuris atsiranda sužadinus medžiagą ją veikiant šviesa. Bandymu įvertinamas fotocitotoksiškumas, nustatant santykinį ląstelių gyvybingumo mažėjimą, kai jos veikiamos chemine medžiaga esant šviesai, palyginti su gyvybingumo mažėjimu tamsoje. Tikėtina, kad šiuo bandymu nustatytos medžiagos yra fototoksiškos *in vivo* po to, kai organizmas jomis buvo veikiamas sisteminiu būdu ir jos pateko į odą arba kai jomis veikiama konkreči odos vieta.

Apie daug cheminių medžiagų rūšių yra paskelbta, jog jos sukelia fototoksišią poveikį (1) (2) (3) (4). Visų jų bendra savybė – gebėjimas sugerti saulės šviesos bangų ilgio energiją. Pagal pirmąjį fotochemijos dėsnį (*Grotthaus-Draper* dėsnį) fotocheminei reakcijai vykti turi būti sugertas pakankamas šviesos kvantų kiekis. Taigi prieš planuojant biologinį bandymą, turi būti nustatytas bandomosios cheminės medžiagos UV/matomosios šviesos sugerties spektras pagal OECD bandymų rekomendaciją 101. Buvo padaryta prielaida, kad jei molinis ekstinkcijos/sugerties koeficientas yra mažesnis kaip  $10 \text{ l} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ , maža tikimybė, kad cheminė medžiaga yra fotochemiškai aktyvi. Tokių medžiagų nebūtina bandyti atliekant 3T3 NRU fototoksiškumo *in vitro* arba bet kurią kitą biologinį bandymą neigiamam fotocheminiam poveikiui nustatyti (1) (5). Taip pat žr. 1 priedėlį.

3T3 NRU fototoksiškumo *in vitro* bandymo patikimumas ir tinkamumas buvo įvertintas neseniai (6) (7) (8) (9). Buvo įrodyta, kad pagal 3T3 NRU fototoksiškumo *in vitro* bandymą galima prognozuoti ūmų fototoksišią 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 fototoksiniio potencialo. Be to, bandymas netinka, jei norima nustatyti netiesioginius fototoksiškumo mechanizmus, bandomosios medžiagos metabolitų poveikį arba mišinių poveikį.

Nors iš esmės reikalaujama, kad atliekant visus *in vitro* bandymus genotoksiniam ir kancerogeniniam potencialui prognozuoti, būtina naudoti metabolinės sistemos, fototoksikologijoje iki šiol yra tik reti pavyzdžiai, kai medžiaga turi patirti metabolinį virsmą, kad *in vivo* arba *in vitro* ji veiktų kaip fototoksiška medžiaga. Todėl reikalavimas šį bandymą atlikti naudojant metabolinės aktyvacijos sistemą nėra laikomas būtinu arba moksliai pagrįstu.

## 1.2. APIBRĖŽTYS

**Energinė apšvieta** – ultravioletinės (UV) arba matomosios šviesos, krentančios ant paviršiaus, intensyvumas, išreiškiamas  $\text{W}/\text{m}^2$  arba  $\text{mW}/\text{cm}^2$ .

**Šviesos dozė** – ultravioletinės (UV) arba matomosios šviesos, krentančios ant paviršiaus, kiekis (= intensyvumas  $\times$  laikas), išreikštas J (=  $\text{W} \times \text{s}$ ) ploto vienetui, pvz.,  $\text{J}/\text{m}^2$  arba  $\text{J}/\text{cm}^2$ .

**UV šviesos bangų juostos** – TRK (*Tarptautinė apšvietimo komisija*) rekomendavo šiuos žymenis: UVA (315–400 nm), UVB (280–315 nm) ir UVC (100–280 nm). Be to, naudojami kiti žymenys; UVB ir UVA skiriamoji riba dažnai yra 320 nm, o UVA galima padalyti į UV-A1 ir UV-A2, skiriamąją ribą nustačius ties maždaug 340 nm.

**Ląstelių gyvybingumas** – suminio ląstelių populiacijos aktyvumo įvertinimo parametras (pvz., vitalinio neutraliojo raudonojo dažiklio sugėrimas ląstelių lizosomose), kuris, atsižvelgiant į galutinį matuojamą dydį ir taikomą bandymo schemą, yra susijęs su suminių ląstelių kiekiu ir (arba) jų gyvybingumu.

**Santykinis ląstelių gyvybingumas** – ląstelių gyvybingumas, palyginti su gyvybingumu, gautu naudojant neigiamus kontrolinius (nešiklio) bandinius, kuriems buvo taikoma visa bandymo procedūra (arba + Irr arba –Irr), tačiau jie nebuvo veikiami bandomąja chemine medžiaga.

**FDF (fotodirginimo faktorius)** – faktorius, išreiškiantis dviejų vienodai efektyvių bandomosios medžiagos citotoksinių koncentracijų verčių ( $\text{IC}_{50}$ ), gautų nesant (–Irr) ir esant (+ Irr) necitotoksiniam švitinimui UVA/matomąja šviesa, santykį.



**IC<sub>50</sub>** – bandomosios medžiagos koncentracija, kuriai esant ląstelių gyvybingumas sumažėja 50 %.

**VFE (vidutinis fotoefektas)** – matmuo, nustatytas atliekant koncentracijos ir atsako kreivę, gautų nesant (–Irr) ir esant (+ Irr) necitotoksiniam švitinimui UVA/matomąja šviesa, matematinę analizę.

**Fototoksiškumas** – ūmus toksinis atsakas, kuris atsiranda, kai oda iš pradžių veikiama tam tikromis cheminėmis medžiagomis, o vėliau šviesa, arba kuris panašiai sukeliamas, kai oda apšvitinama po to, kai organizmui sisteminiu būdu buvo duodama bandomoji cheminė medžiaga.

### 1.3. BANDYMO METODO PRINCIPAS

3T3 NRU fototoksiškumo *in vitro* bandymas yra pagrįstas cheminės medžiagos citotoksiškumo lyginimu, kai ji bandoma, būdama apšvitinta modeliuojamos saulės šviesos necitotoksine doze, ir tamsoje. Šiame bandyme citotoksiškumas yra išreiškiamas kaip su koncentracija susijęs vitalinio neutraliojo raudonojo (NR) dažiklio sugėrimo mažėjimas, išmatuotas praėjus 24 h po veikimo chemine medžiaga ir švitinimo (10). NR yra silpnas katijoninis dažiklis, kuris ne difuzijos būdu lengvai prasiskverbia per ląstelių membranas, susikaupdamas ląstelių lizosomose. Dėl jautrių lizosomos membranų ląstelių paviršiaus pakitimų lizosomos darosi trapios, be to, vyksta kiti pakitimai, kurie laipsniškai tampa negrįžtamais. Dėl tokių ksenobiotikais sukeltų pakitimų mažėja NR sugėrimas ir surišimas. Taigi įmanoma atskirti gyvybingas, pažeistas arba žuvusias ląsteles, o tai yra šio bandymo pagrindas.

Balb/c veislės pelių 3T3 ląstelės 24 h laikomos kultūroje monosluoksniui gauti. Iš pradžių kiekviena bandomoji medžiaga (8 skirtingų dydžių jos koncentracijos) 1 h inkubuojama dviejose 96 duobučių lėkštelėse. Vėliau viena iš lėkštelių apšvitinama didžiausia doze, kuri nėra citotoksiška, o kita lėkštelė laikoma tamsoje. Tuomet abiejų lėkštelių apdoravimo terpė yra keičiama kultūros terpe ir dar po 24 h inkubavimo ląstelių gyvybingumas nustatomas, matuojant neutraliojo raudonojo sugėrimą. Ląstelių gyvybingumas išreiškiamas kaip procentinė neapdorotų tirpiklio kontrolinių bandinių gyvybingumo dalis ir apskaičiuojamas kiekvienai bandomajai koncentracijai. Fototoksiniams potencialui prognozuoti lyginami atsakai į skirtingas medžiagas, apšvitintos arba laikytos tamsoje, koncentracijas, kai lygis paprastai būna IC<sub>50</sub>, t. y. toks kad ląstelių gyvybingumas sumažėja iki 50 % palyginti su neapdorotais kontroliniais bandiniais.

### 1.4. BANDYMO METODO APRAŠYMAS

#### 1.4.1. Paruošiamieji darbai

##### 1.4.1.1. Ląstelės

Atliekant tinkamumo patvirtinimo bandymą, buvo naudojama nepertraukiama pelių fibroblastų linija, Balb/c 3T3, 31 klonas, iš *American Type Culture Collection (ATCC)*, Manassas, VA, JAV arba *European Collection of Cell Cultures (ECACC)*, Salisbury, Wiltshire, JK, todėl rekomenduojama naudoti šias ląsteles, gautas iš reikalavimus atitinkančios ląstelių saugyklos. Pagal tą pačią bandymo procedūrą galima naudoti kitas ląsteles arba ląstelių linijas, jei kultivavimo sąlygos pritaikomos specifiniams ląstelių poreikiams, tačiau turi būti įrodytas lygiavertiškumas.

Ląstelės turi būti reguliariai tikrinamos, ar jos neužterštos mikoplazma, ir naudojamos tik jei jos visiškai nėra (11).

Svarbu, kad ląstelių jautrumas UV spinduliutei būtų reguliariai tikrinamas pagal šią metodą aprašytą kokybės kontrolės procedūrą. Kadangi ląstelių jautrumas UVA gali padidėti didėjant persėjimų skaičiui, turėtų būti naudojamos mažiausio turimo persėjimų skaičiaus Balb/c 3T3 ląstelės, pageidautina mažesnio kaip 100 (žr. 1.4.2.2.2 skirsnį ir 2 priedėlį).

##### 1.4.1.2. Terpės ir auginimo sąlygos

Įprastu būdu persėjant ląsteles ir atliekant bandymo procedūras, turi būti naudojama tinkama kultivavimo terpė ir paisoma inkubavimo sąlygų, pvz., Balb/c 3T3 ląstelių terpė yra DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*), papildyta 10 % naujagimių veršelių serumu, 4 mmol/l glutamino, penicilinu (100 TV) ir streptomycinu (100 µg/ml); inkubuojama drėgnoje atmosferoje, esant 37 °C, o CO<sub>2</sub> kiekis siekia 5–7,5 %, priklausomai nuo buferinio tirpalo (žr. 1.4.1.4 skirsnio antrą pastraipą). Ypač svarbu, kad ląstelių kultivavimo sąlygos leistų užtikrinti ląstelių ciklo trukmę, kuri atitinka įprastą naudojamų ląstelių arba jų linijų gyvavimo laikotarpį.

##### 1.4.1.3. Kultūrų ruošimas

Užšaldytų pradinių kultūrų ląstelės sėjamos kultivavimo terpėje atitinkamu tankiu ir bent kartą persėjamos prieš jas naudojant 3T3 NRU fototoksiniame poveikio *in vitro* bandyme.



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  $1 \times 10$  ląstelių vienoje duobutėje.

Kiekvienai bandomajai cheminei medžiagai skirtos ląstelės vienodai sėjamos į 2 atskiras 96 duobučių lėkšteles, kurios lygiagrečiai naudojamos visame bandyme, esant vienodoms kultivavimo sąlygoms, išskyrus laikotarpį, kai vienos lėkštelės ląstelės švitinamos (+ Irr), o kitos – laikomos tamsoje(-Irr).

#### 1.4.1.4. Bandomosios medžiagos ruošimas

Bandomos cheminės medžiagos turi būti iš naujo ruošiamos prieš pradėdant bandymą, išskyrus atvejus, kai turimi duomenys įrodo jų stabilumą laikymo sąlygomis. Rekomenduojama visus cheminės medžiagos paruošimo ir ląstelių pradinio apdoravimo 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 pusiausvuruose buferiniuose tirpaluose, kuriuose neturi būti baltymų komponentų (pvz., pH indikatorinių dažiklių ir vitaminų), kad būtų išvengta trukdžių švitinant. Kadangi švitinamos ląstelės maždaug 50 min. laikomos ne CO<sub>2</sub> inkubatoriuje, reikia imtis priemonių šarmo koncentracijos didėjimui išvengti. Jei naudojami mažos talpos buferiniai tirpalai, pvz., EBSS, pH didėjimo išvengti galima, jei ląstelės inkubuojamos esant 7,5 % CO<sub>2</sub>. Jei ląstelės inkubuojamos esant tik 5 % CO<sub>2</sub>, reikėtų pasirinkti didesnės talpos buferinį tirpalą.

Cheminės medžiagos, kurių tirpumas vandenyje yra ribotas, turi būti tirpinamos atitinkamame tirpiklyje. Jei naudojamas tirpiklis, jo tūris visose kultivavimo terpėse, t. y. neigiamuose (tirpiklių kontroliniuose) bandiniuose ir visų bandomosios medžiagos koncentracijos verčių bandiniuose, turi būti vienodas, ir tirpiklis neturi būti citotoksiškas esant tokiai jo koncentracijai. Bandomosios medžiagos koncentracijos vertės pasirenkamos taip, kad nesusidarytų nuosėdos arba drumsti tirpalai.

Rekomenduojami tirpikliai yra dimetilsulfoksidas (DMSO) ir etanolis (ETOH). Gali tikti ir kiti mažai citotoksiniai tirpikliai. Prieš naudojant turi būti patikrintos visų tirpiklių konkrečios savybės, pvz., reagavimas su bandomąja medžiaga, fototoksinio poveikio slopinimas, radikalų sugavimo ir (arba) cheminio stabilumo tirpiklyje savybės.

Tirpinimui palengvinti galima naudoti sūkurinį ir (arba) ultragarsinį maišymą ir (arba) šildymą iki atitinkamos temperatūros, jei tai neturi įtakos bandomosios cheminės medžiagos stabilumui.

#### 1.4.1.5. Švitinimo sąlygos

##### 1.4.1.5.1. Šviesos šaltinis

Tiriant medžiagų fototoksiškumą, tinkamo šviesos šaltinio bei šviesos filtrų pasirinkimas yra svarbiausias veiksnys. UVA bei matomosios šviesos sritys paprastai yra susijusios su fototoksinėmis reakcijomis *in vivo* (3) (12), o UVB sritis apskritai yra mažiau svarbi ir yra ypač citotoksinė; citotoksinės savybės stiprėja 1 000 kartų, jei bangos ilgis sumažėja nuo 313 iki 280 nm (13). Tarp tinkamo šviesos šaltinio pasirinkimo kriterijų turi būti reikalavimas, kad šviesos šaltinio spinduliuotė atitiktų bandomosios cheminės medžiagos sugeriamos spinduliuotės bangos ilgį (sugerties spektrą), o šviesos dozės (pasiekiamos per priimtą veikimo trukmę) pakaktų žinomoms fototoksiškoms medžiagoms nustatyti. Be to, naudojami bangų ilgiai ir dozės neturi per daug kenkti bandymo sistemai, pvz., šilumos spinduliuavimas (infraraudonoji sritis).

Manoma, kad optimalus būdas dirbtinei šviesai gauti yra saulės šviesos imitatoriai. Filtruojamojo saulės šviesos imitatoriaus švitinimo galios pasiskirstymas turi būti artimas (14) nurodytai dienos šviesai lauko sąlygomis. Saulės šviesos imitatoriuose naudojamos ksenono ir gyvsidabrinės metalų halogenidų (legiruotos) lempos (15). Pastarųjų privalumas – mažesnis spinduliuojamos šilumos kiekis, be to, jos yra pigesnės, tačiau ne taip tiksliai atitinka saulės šviesos spektrą palyginti su ksenono lempomis. Kadangi didelę visų saulės šviesos imitatorių spinduliuotės dalį sudaro UVB spinduliuotė, jie turi būti tinkamai filtruojami, kad susilpnintų labai citotoksinę UVB bangų ilgio spinduliuotę. Kadangi ląstelių kultūrai naudojamos plastikinės medžiagos turi UV stabilizatorių, spektras turi būti matuojamas per tokio paties, kaip ir bandyme naudojamo tipo 96 duobučių lėkštelės dangtį. Kad ir kokių būtų imamasi priemonių spektro dalims silpninti filtravimu ir nepaisant neišvengiamo įrangos filtruojamojo poveikio, šiuos filtrus praėjusios šviesos spektras neturi nukrypti nuo etaloninės dienos šviesos lauko sąlygomis (14). Filtruojamojo saulės šviesos imitatoriaus, naudojamo vykdam 3T3 NRU fototoksiškumo *in vitro* bandymo tinkamumo patvirtinimo bandymą, spinduliuotės spektro skirstinio pavyzdys pateiktas (8) (16). Taip pat žr. 2 priedėlio 1 paveikslą.

##### 1.4.1.5.2. Dozimetrija

Šviesos intensyvumas (energinė apšvieta) turėtų būti reguliariai tikrinamas prieš kiekvieną fototoksiškumo bandymą, naudojant tinkamą plačiajuostį UV spinduliuotės matuoklį. Intensyvumas turi būti matuojamas per tokio paties, kaip ir bandyme naudojamo tipo 96 duobučių plokštelės dangtį. UV spinduliuotės

matuoklis turi būti kalibruojamas pagal šviesos šaltinį. UV spinduliuotės matuoklio veikimą būtina tikrinti, ir šiam tikslui rekomenduojama naudoti antrą to paties tipo ir vienodo kalibravimo UV spinduliuotės matuoklį. Būtų geriausia, jei filtruojamo šviesos šaltinio spektrinei energinei apšvietai matuoti ir plačiajuosčio UV spinduliuotės matuoklio kalibravimui tikrinti kas tam tikrą ilgesnį laiko tarpą būtų naudojamas spektrometras.

Buvo nustatyta, kad 5 J/cm dozė (išmatuota UVA srityje) nėra citotoksiška Balb/c 3T3 ląstelėms ir jos pakanka sužadinti chemines medžiagas, kad būtų sukeltos fototoksinės reakcijos (6) (17), pvz., norint pasiekti 5 J/cm<sup>2</sup> per 50 min laikotarpį, nustatoma 1,7 mW/cm<sup>2</sup> energinė apšvietai. Žr. 2 priedėlio 2 paveikslą. Jei naudojama kita ląstelių linija arba skirtingas šviesos šaltinis, švitinimo dozė gali tekti kalibruoti taip, kad būtų galima pasirinkti tokį dozės režimą, kuris nebūtų kenksmingas ląstelėms, bet kuriuo gautos dozės pakaktų sužadinti etalonines fototoksines medžiagas. Šviesos trukmė apskaičiuojama taip:

$$t(\text{min}) = \left( \frac{(\text{švitinimodozė } (J / (\text{cm}^2)) \times 1000)}{(\text{energinė apšvietai } (mW / (\text{cm}^2)) \times 60)} \right) \quad (1 J = 1W \times s)$$

#### 1.4.2. Bandyto sąlygos

##### 1.4.2.1. Bandomosios medžiagos koncentracijos vertės

Cheminės medžiagos, bandomos šviesoje (+ Irr) ir tamsoje (-Irr), koncentracijos verčių intervalas turi būti tinkamai nustatytas dozės intervalo radimo bandymais. Gali būti naudinga nustatyti pradinį tirpumą ir po 60 min. (arba po tiek laiko, kiek skiriama veikimui medžiaga), kadangi tirpumas laikui bėgant arba švitinimo laikotarpiu gali pasikeisti. Siekiant išvengti toksinio poveikio, kurį sukelia netinkamos kultivavimo sąlygos arba labai šarminės arba rūgštinės cheminės medžiagos, ląstelių kultūrų pH vertės intervalas, pridėjus cheminės medžiagos, turėtų būti 6,5–7,8.

Didžiausia bandomosios medžiagos koncentracija turi atitikti fiziologines bandymo sąlygas, pvz., turėtų būti išvengta įtempimo, kurį sukelia osmozė ir pH. Nelygu, kokia yra bandomoji cheminė medžiaga, gali tekti atsižvelgti į kitas fizikines ir chemines savybes, pvz., į veiksmus, ribojančius didžiausią bandomąją koncentraciją. Palyginti mažai tirpios medžiagos, kurios nėra toksiškos iki pat soties koncentracijos, turėtų būti bandomos esant didžiausiai įmanomai koncentracijai. Apskritai turėtų būti išvengta bandomosios medžiagos nuosėdų susidarymo esant bet kuriai bandomajai koncentracijai. Didžiausia bandomosios medžiagos koncentracija neturėtų būti didesnė kaip 1 000 µg/ml; osmolingumas neturi būti didesnis kaip 10 mmol. Naudojamos 8 bandomosios medžiagos koncentracijos vertės, kurios, skiedžiamos pagal tą patį skiedimo faktorių, sudaro geometrinę progresiją (žr. 2.1 skirsnio antrąją pastraipą).

Jei yra informacijos (gautos intervalo radimo bandymu), kad atliekant bandymą tamsoje (-Irr) bandomoji cheminė medžiaga nėra citotoksiška iki pat ribinės koncentracijos, bet švitinama (+ Irr) yra labai citotoksiška, norint atitikti tinkamos duomenų kokybės reikalavimą, (+ Irr) ir (-Irr) bandymams pasirinkti koncentracijos intervalai gali skirtis.

##### 1.4.2.2. Kontroliniai bandiniai

##### 1.4.2.2.1. Ląstelių jautrumas spinduliuotei, ankstesnių bandymų duomenys

Turi būti reguliariai (maždaug kas penktą pasėjimą) tikrinamas ląstelių jautrumas šviesos šaltiniui, įvertinant jų gyvybingumą po veikimo didėjančiomis spinduliuotės dozėmis. Įvertinant turi būti naudojamos kelios spinduliuotės dozės, įskaitant tokias, kurios yra gerokai didesnės negu naudojama 3T3 NRU fototoksiškumo bandymui. Lengviausias šių dozių kiekybinio įvertinimo būdas – matuoti šviesos šaltinio UV spinduliuotės dalis. Ląstelės sėjamos tokiu tankumu, kuris naudojamas 3T3 NRU fototoksinio poveikio *in vitro* bandyme, ir apšvitinamos kitą dieną. Dar po dienos išmatuojamas ląstelių gyvybingumas, naudojant neutraliojo raudonojo sugėrimą. Turi būti įrodyta, kad gautos didžiausios necitotoksinės dozės (pvz., atliekant tinkamumo patvirtinimo bandymą: 5 J/cm [UVA]) pakanka etaloninėms cheminėms medžiagoms (1 lentelė) tinkamai klasifikuoti.

##### 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  $1 \times 10^4$  ląstelės augo dvi bandymo dienas esant normaliam dvigubėjimo laikui. Bandymas atitinka priimtino kriterijus, jei vidutinė neapdorotų kontrolinių bandinių OD540 Nru vertė yra > 0,4 (t. y. maždaug dvigubėjimą kartą didesnė už fonui naudojamą tirpiklio optinį tankį).

#### 1.4.2.2.4. Teigiamas kontrolinis bandinys

Lygiagrečiai kiekvienam 3T3 NRU fototoksinio poveikio *in vitro* bandymui turi būti bandoma žinoma fototoksiška medžiaga. Rekomenduojamas chlorpromazinas (CPZ). CPZ bandant pagal etaloninį 3T3 NRU fototoksiškumo *in vitro* bandymo protokolą, buvo apibrėžti šie bandymo priimtimumo kriterijai: CPZ apšvitinus (+ Irr): IC50 = 0,1–2,0 µg/ml, CPZ tamsoje (-Irr): IC50 = 7,0–90,0 µg/ml. Fotodirginimo faktorių (FDF) turėtų būti > 6. Turi būti stebimi anksčiau gauti teigiamo kontrolinio bandinio duomenys.

Vietoj chlorpromazino kaip lygiagrečiai bandomi teigiami kontroliniai bandiniai gali būti naudojami kitos fototoksiškos medžiagos, tinkančios dėl cheminės medžiagos klasės arba tirpumo charakteristikų.

#### 1.4.3. **Bandymo eiga (6) (7) (8) (16) (17)**

##### 1.4.3.1. *1-oji diena*

Į kraštines 96 duobučių audinių kultūros mikrotitravimo lėkštelės duobutes įlašinama po 100 µl kultivavimo terpės (= tuštieji bandiniai). Į likusias duobutes įlašinama po 100 µl ląstelių suspensijos, kurios koncentracija  $1 \times 10^5$  ląstelių/ml kultivavimo terpės (=  $1 \times 10^4$  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 µl inkubavimui naudoto buferinio tirpalo. Įpilama 100 µl buferinio tirpalo, kuriame būtų tinkamos koncentracijos bandomoji cheminė medžiaga, arba tirpiklis (tirpiklio kontrolinis bandinys). Naudojamos 8 skirtingos bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos vertės. Ląstelės su bandomąja medžiaga inkubuojamos tamsoje 60 min. (žr. 1.4.1.2 skirsnį ir 1.4.1.4 skirsnio antrąją pastraipą).

Iš dviejų lėkščių, 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).

Esant kambario temperatūrai, ląstelės 50 min. veikiamos šviesa (+ Irr) per 96 duobučių lėkštelės dangtį, naudojant didžiausią dar neцитotoksišnę spinduliuotės dozę (taip pat žr. 2 priedėlį). Neapšviestos lėkštelės (-Irr) 50 min. (= veikimo šviesa trukmė) laikomos tamsoje dėžėje, esant kambario temperatūrai.

Bandomasis tirpalas nupilamas ir ląstelės kruopščiai du kartus plaunamos 150 µl inkubavimui naudoto buferinio tirpalo, kuriame nebūtų bandomosios medžiagos. Buferinis tirpalas keičiamas kultivavimo terpe ir ląstelės inkubuojamos (žr. 1.4.1.2 skirsnį.) per naktį (18–22 h).

##### 1.4.3.3. *3-ioji diena*

##### 1.4.3.3.1. Mikroskopinis tyrimas

Ląstelių augimas, morfologija ir monosluoksnio vientisumas turi būti ištirtas fazių kontrasto mikroskopu. Turi būti užrašyti ląstelių morfologiniai pokyčiai ir poveikis jų augimui.

##### 1.4.3.3.2. Neutraliojo raudonojo dažiklio sugėrimo bandymas

Ląstelės plaunamos 150 µl iš anksto pašildyto buferinio tirpalo. Plovimo tirpalas pašalinamas atsargiai išleidžiant. Į terpę be serumo (16) įpilama 100 µl 50 µg/ml neutralaus raudonojo (NR) (3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazino hidrochlorido, Einecs numeris 209–035–8; CAS numeris 553–24–2; C.I. 50040) ir 3 h inkubuojama, kaip aprašyta 1.4.1.2 skirsnyje. Po inkubavimo NR terpė pašalinama ir ląstelės plaunamos 150 µl buferinio tirpalo. Buferinio tirpalo perteklius pašalinamas nusausinant arba centrifuguojant.

Įpilama tiksliai 150 µl tirpalo NR desorbuoti (tik ką paruošto: 49 dalys vandens + 50 dalių etanolio + 1 dalis acto rūgšties).

Mikrotitravimo lėkštelė nestipriai purtoma 10 min. ant mikrotitravimo lėkštelės purtyklės tol, kol NR ekstrahuojamas iš ląstelių ir susidaro vienalytis tirpalas.

Spektrofotometru matuojamas NR ekstrakto optinis tankis esant 540 nm, palyginamuoju tirpalu naudojant tuščiuosius bandinius. Duomenys saugomi atitinkamo formato elektroninėje laikmenoje vėlesnei analizei.

## 2. DUOMENYS

### 2.1. DUOMENŲ KOKYBĖ IR KIEKYBĖ

Pagal bandymų duomenis turėtų būti įmanoma atlikti prasmingą koncentracijos ir atsako, gauto veikiant šviesa ir tamsoje ir, jei įmanoma, nustatyti bandomosios medžiagos koncentraciją, kuriai esant ląstelių gyvybingumas sumažėja 50 % (IC<sub>50</sub>). 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.

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 apytaksimuojama 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<sub>50</sub> apšvietimo ir tamsos sąlygomis negalima apskaičiuoti, negalima nustatyti bandomosios medžiagos FDF. Vidutinis fotoefektas (VFE) yra pagrįstas visų koncentracijos ir atsako kreivių lyginiu (19). Jis apibrėžiamas kaip tipinių fotoefekto verčių rinkinio svertinis vidurkis

$$MPE = \frac{\left( \sum_{i=1}^n w_i PE_{C_i} \right)}{\left( \sum_{i=1}^n w_i \right)}$$

Kurią nors koncentraciją C atitinkantis fotoefektas PE<sub>C</sub> apibrėžiamas kaip atsako RE<sub>C</sub> ir dozės DE<sub>C</sub> efektų sandauga, t. y. PE<sub>C</sub> = RE<sub>C</sub> x DE<sub>C</sub>. Atsako efektas RE<sub>C</sub> yra atsakų, nustatomų tamsoje ir veikiant šviesa, skirtumas, t. y. RE<sub>C</sub> = R<sub>C</sub>(-Irr) – R<sub>C</sub>(+ 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<sub>C</sub>(-Irr), dozės efektas prilyginamas 1. Svoriniai faktoriai w<sub>i</sub> nustatomi pagal didžiausią atsako vertę, t. y. W<sub>i</sub> = MAX{R<sub>i</sub>(+ Irr), R<sub>i</sub>(-Irr)}. Koncentracijos verčių C<sub>i</sub> tinklulis 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<sub>C</sub> = 0,15), cheminė medžiaga klasifikuojama kaip fototoksiška.

Programinės įrangos rinkinį, kuris naudojamas apskaičiuojant FDF ir VFE, galima rasti (20).

### 2.3. REZULTATŲ AIŠKINIMAS

Pagal tinkamumo patvirtinimo bandymo duomenis (8) prognozuojama, kad bandomoji medžiaga, kurios FDF < 2 arba VFE < 0,1, yra nefototoksišė. Kai  $2 < \text{FDF} < 5$  arba  $0,1 < \text{VFE} < 0,15$ , prognozuojama: tikėtina, kad fototoksiška; o kai FDF > 5 arba VFE > 0,15, prognozuojama: fototoksiška.

Visos laboratorijos, pradedančios taikyti šį bandymą, iš pradžių turi išbandyti 1 lentelėje išvardytas etalones medžiagas prieš pradėdamos bandyti bandomąsias medžiagas jų fototoksiškumui įvertinti. FDF arba VFE vertės turi būti artimos 1 lentelėje nurodytoms vertėms.

**1 lentelė**

Cheminis pavadinimas	Einecs Nr.	CAS Nr.	PDF	VFE	Sugerties maksimumas	Tirpiklis (1)
Amiodaronas HCl	243-293-2	[19774-82-4]	> 3,25	0,20-0,54	242 nm 300 nm (petys)	etanolis
Choloropromazina s HCl	200-701-3	[69-09-0]	> 14,4	0,33-0,63	309 nm	etanolis
Norfloksacinas	274-614-4	[70458-96-7]	> 71,6	0,34-0,90	316 nm	acetonitrilas
Antracenas	204-371-1	[120-12-7]	>18,5	0,19-0,81	356 nm	acetonitrilas
Protoporfirinas IX, dinatrio	256-815-9	[50865-01-5]	> 45,3	0,54-0,74	402 nm	etanolis
L-Histidinas		[7006-35-1]	nėra PDF	0,05-0,10	211 nm	vanduo
Heksacholorofenas	200-733-8	[70-30-4]	1,1-1,7	0,00-0,05	299 nm 317 nm (petys)	etanolis
Natrio laurilsulfatas	205-788-1	[151-21-3]	1,0-1,9	0,00-0,05	nesugerinama	vanduo

(1) Tirpiklis, naudotas sugerčiai matuoti.

### 2.4. DUOMENŲ AIŠKINIMAS

Jei fototoksiškumas stebimas tik esant didžiausiai bandomajai koncentracijai (ypač, vandenyje tirpių bandomųjų cheminių medžiagų), pavojui įvertinti gali reikėti papildomų analizės duomenų, pavyzdžiui, sugerties per odą, cheminės medžiagos kaupimosi odoje duomenų ir (arba) kitų bandymų duomenų, kaip antai cheminės medžiagos *in vitro* bandymų su gyvūnų arba žmonių oda arba su odos modeliais duomenų.

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

Bandyto ataskaitoje turi būti pateikta bent tokia informacija:

Bandomoji medžiaga:

- tapatumas, įprasti bendrieji pavadinimai ir IUPAC pavadinimai bei CAS numeris, jei žinomas;
- fizikinė būsena ir grynumas;
- fizikinės ir cheminės savybės, svarbios atliekamam bandymui;
- UV/matomosios srities sugerties spektras;
- stabilumas ir fotocheminis stabilumas, jei žinomas.

Tirpiklis:

- tirpiklio pasirinkimo pagrindimas;
- bandomosios cheminės medžiagos tirpumas tirpiklyje;
- tirpiklio kiekio, esančio apdorojimo terpėje, procentinė dalis.

Ląstelės:

- ląstelių tipas ir šaltinis;
- mikoplazmos nebuvimo patvirtinimas;
- ląstelių sėjimų skaičius, jei žinomas;
- ląstelių jautrumas spinduliutei, nustatytas švitinimo įranga, naudojama atliekant 3T3 NRU fototoksinio poveikio *in vitro* bandymą.

Bandyto sąlygos (1); *inkubacija prieš ir po apdorojimo*:

- kultivavimo terpės tipas ir sudėtis;
- inkubacijos sąlygos (CO<sub>2</sub> koncentracija, temperatūra, drėgmė);
- inkubacijos trukmė (prieš apdorojimą, po apdorojimo).

Bandyto sąlygos (2); *veikimas chemine medžiaga*:

- bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos, kuri naudojama švitinant ir nešvitinant, pasirinkimo pagrindimas;
- riboto bandomosios cheminės medžiagos tirpumo atveju ir nesant citotoksiškumo: didžiausios bandytos koncentracijos pagrindimas;
- veikimo terpės tipas ir sudėtis (buferinis druskos tirpalas);

- veikimo chemine medžiaga trukmė.

Bandymo sąlygos (3); švitinimas:

- pasirinkto šviesos šaltinio pagrindimas;
- šviesos šaltinio ir radiometro gamintojas ir tipas;
- šviesos šaltinio spektrinės energinės apšvietos charakteristikos;
- naudojamo (-ų) filtro (-ų) praleidimo ir sugerties charakteristikos;
- radiometro charakteristikos ir išsami informacija apie jo kalibravimą;
- šviesos šaltinio atstumas iki bandymo sistemos;
- UVA energinė apšvieta esant šiam atstumui, išreikšta  $\text{mW}/\text{cm}^2$ ;
- švitinimo UV/matomąja šviesa trukmė;
- UVA dozė (energinė apšvieta laikas), išreikšta  $\text{J}/\text{cm}^2$ ;
- 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 ( $\text{CO}_2$  koncentracija, temperatūra, drėgmė);
- neutraliojo raudonojo ekstrahavimo sąlygos (tirpiklis, trukmė);
- neutraliojo raudonojo optinio tankio spektrofotometrinio matavimo bangos ilgis;
- antrasis (etaloninis) bangos ilgis, jei naudojamas;
- spektrofotometriniams matavimams 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,  $\text{IC}_{50}$  (+ Irr) ir  $\text{IC}_{50}$  (-Irr) apskaičiavimas;
- dviejų koncentracijos ir atsako kreivių, gautų švitinant ir tamsoje, lyginimas, apskaičiuojant fotodirginimo faktorių (FDF) arba vidutinį fotoefektą (VFE);

- bandymo priimtimumo kriterijai; lygiagretus tirpiklio kontrolinis bandinys;
- švitintų ir nešvitintų ląstelių absoliutusis gyvybingumas (neutrального raudonojo ekstrakto optinis tankis);
- anksčiau gauti neigiamų ir tirpiklių kontrolinių bandinių duomenys; vidutinės vertės ir standartiniai nuokrypiai;
- bandymo priimtimumo kriterijai; lygiagretus teigiamas kontrolinis bandinys;
- teigiamo kontrolinio bandinio IC<sub>50</sub> (+ Irr) ir IC<sub>50</sub> (-Irr) bei FDF/VFE;
- anksčiau gauti teigiamų kontrolinių bandinių duomenys: IC<sub>50</sub> (+ Irr) ir IC<sub>50</sub> (-Irr) bei FDF/VFE; vidurkiai ir standartiniai nuokrypiai.

Rezultatų aptarimas.

Išvados.

#### 4. NUORODOS

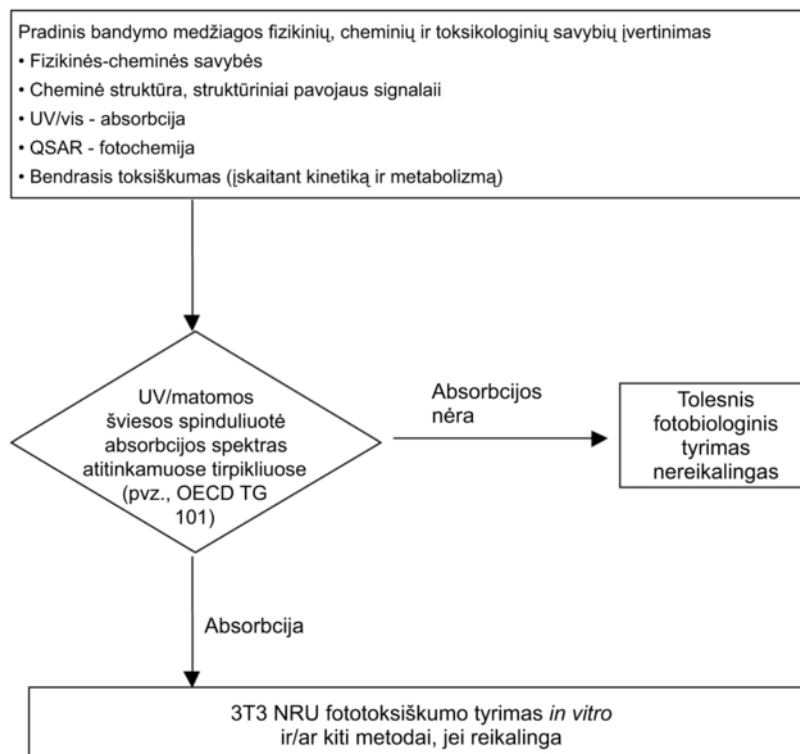
- 1) Phototoxicity Test Guideline Proposal, Berlin, 30–31th October 2001, Secretariat's Final
- 2) Loveli W.W. (1993). A scheme for *in vitro* screening of substances for photoallergenic potential. Toxic. In Vitro 7: p. 95–102.
- 3) Santamaria, L. and Prino, G. (1972). List of the photodynamic substances. 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., Sappora, 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., Pfannenbecker, 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 ES/COLIPA *In vitro* phototoxicity validation study: results of phase II (blind trial), part 1: the 3T3 NRU phototoxicity test. Toxic. In Vitro 12, p. 305–327.
- 10) OECD (2002) Extended Expert Consultation Meeting on The In Vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test Guideline Proposal, Berlin, 30–31th October 2001, Secretariat's Final Summary Report, 15 March 2002, OECD ENV7EHS, available upon request from the Secretariat.



- 11) Borenfreund, E., and Puerner, J.A. (1985). Toxicity determination *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicology Lett.*, 24, 119–124.
- 12) Hay, R.J. (1988) The seed stock concept and quality control for cell lines. *Analytical Biochemistry* 171, 225–237.
- 13) Lambert L.A., Warner W.G., and Kornhauser A. (1996) Animal models for phototoxicity testing. In „Dermatotoxicology“, edited by F.N. Marzulli and h.I. Maibach. Taylor & Francis, Washington DC. 5th Edition, p 515–530.
- 14) Tyrrell R.M., Pidoux M (1987) Action spectra for human skin cells: estimates of the relative cytotoxicity of the middle ultraviolet, near ultraviolet and violet regions of sunlight on epidermal keratinocytes. *Cancer Res.*, 47, 1825–1829.
- 15) ISO 10977. (1993). Photography – Processed photographic colour films and paper prints – Methods for measuring image stability.
- 16) Sunscreen Testing (UV.B) TECHNICALREPORT, CIE, International Commission on 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](http://www.oecd.org/document/55/0,2340,en_2649_34377_2349687_1_1_1_1,00.html)

## 1 PRIEDĖLIS

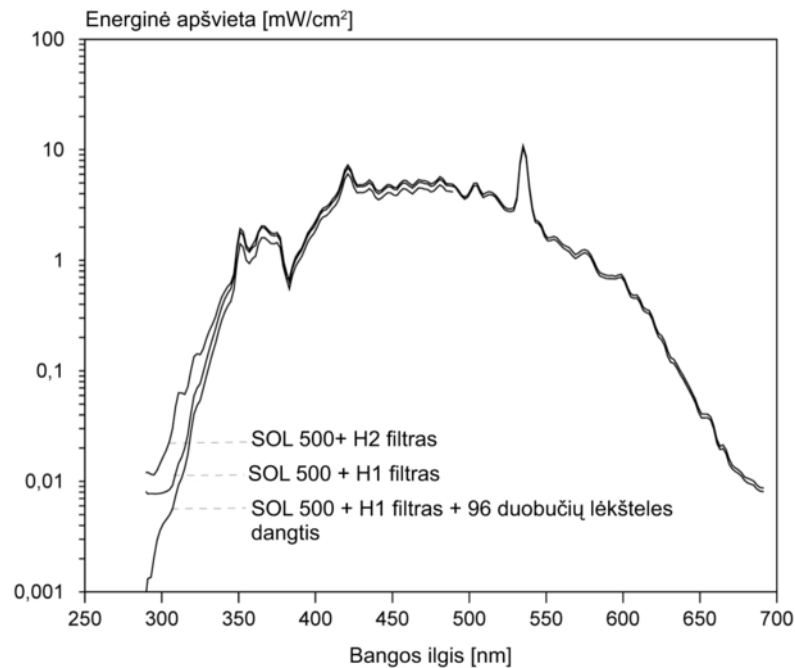
## 3T3 NRU fototoksiškumo bandymo svarba, taikant nuoseklųjį metodą cheminių medžiagų fototoksiškumui tirti



## 2 PRIEDĖLIS

## 1 paveikslas

## Filtruoto saulės šviesos imitatoriaus spektrinės galios skirstinys



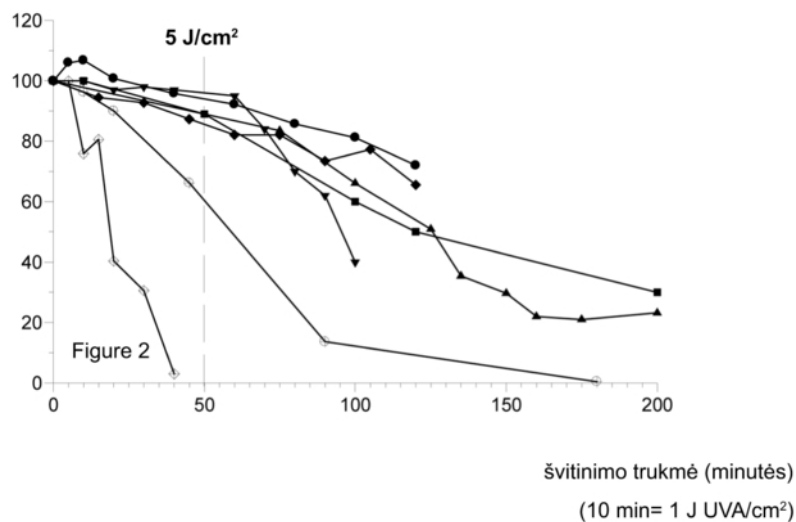
(žr. 1.4.1.5.1 skirsnio antrąją pastraipą)

1 paveiksle pateiktas filtruoto saulės šviesos imitatoriaus priimtino spektrinės energinės apšvietos skirstinio pavyzdys. Jis yra gautas metalų halogenidais legiruotam šaltiniui, naudojamam 3T3 NRU fototoksiškumo bandymo tinkamumo patvirtinimo tyrime (6) (8) (17). Parodyta dviejų skirtingų filtrų ir 96 duobučių lėkštelių 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 liekiant UVB spinduliuotės kiekiui, kurio pakanka cheminėms medžiagoms, paprastai sugeriančioms UVB bangų ilgį, pvz., amiodaronui, sužadinti (žr. 1 lentelę).

## 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 priimtiniu švitinimo ištvėriamumu.

Pagal šiuos duomenis buvo gauta didžiausia necitotoksinė švitinimo dozė  $5 \text{ J/cm}^2$  (vertikali brūkšniuota linija). Horizontali brūkšniuota linija papildomai rodo didžiausią priimtina švitinimo poveikį, nurodytą 1.4.2.2 skirsnyje.

## B.42. ODOS JAUTRINIMAS. VIETINIO LIMFMAZGIO BANDYMAS

## 1. METODAS

Šis bandymų metodas atitinka OECD TG 429 (2002)

## 1.1. ĮVADAS

Vietinio limfmazgio bandymas (*Local Lymph Node Assay* - LLNA) yra pakankamai įteisintas ir priimtas, kad būtų galima jį priimti kaip naują metodą (1) (2) (3). Tai yra antrasis metodas, leidžiantis nustatyti cheminių medžiagų potencialą jautrinti gyvūnų odą. Pagal kitą metodą (B.6) naudojami bandymai su jūrų kiaulytėmis, ypač, maksimizacijos ir Buehlerio bandymas su jūrų 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. Juo 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 metodui (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 reiškinų, 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. Bendrojo įvado B dalį.

## 1.2. BANDYMO METODO PRINCIPAS

Pagrindinis principas, kuriuo pagrįstas LLNA metodas, yra jautrinančiųjų medžiagų sukelta pirminė limfocitų proliferacija cheminės medžiagos uždėjimo vietoj 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 nešiklį 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 pradėdant duoti dozes, kad galėtų priprasti prie laboratorijos sąlygų. Prieš veikimo medžiaga pradžią visi gyvūnai apžiūrimi, ar neturi pastebimų odos pažeidimų.

### 1.3.2. **Bandymo sąlygos**

#### 1.3.2.1. *Bandomieji gyvūnai*

Šiam bandymui pasirinkta gyvūnų rūšis – pelės. Naudojamos jaunos suaugusios CBA/Ca arba CBA/J veislės pelių patelės, kurios yra neturėjusios vados ir neapvaisintos. Pradedant bandymą, gyvūnų amžius turi būti 8–12 savaičių, o gyvūnų masės skirtumas turi būti kiek įmanoma mažesnis ir neviršyti 20 % vidutinės masės. Galima naudoti kitas veisles ir patinus, jei yra gauta pakankamai duomenų, kurie rodytų, kad nėra esminių veislei ir (arba) lyčiai būdingų reakcijos į LLNA skirtumų.

#### 1.3.2.2. *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 merkaptobenziazolas (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 bandymą, 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 veikiančių grupių gyvūnai, išskyrus tai, kad jie negauna bandomosios medžiagos.

Dozė ir nešiklis turi būti pasirenkami atsižvelgiant į rekomendacijas, pateiktas nuorofoje (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 būtų bandomajai medžiagai uždėti. Pirmumo tvarka rekomenduojamas nešiklis yra acetonas ir alyvuogių aliejus (4:1 v/v), dimetilformamidas, metiletiketonas, propilenglikolis ir dimetilsulfoksidas (2) (10), tačiau galima naudoti kitus nešiklius, jei tai būtų tinkamai moksliskai 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 hidrofiliųjų medžiagų, kurios drėkintų odą ir iš karto nenutekėtų. Taigi reikėtų vengti naudoti grynai vandeningus nešiklius.

**1.3.3. Bandy mo eiga**1.3.3.1. *Bandy mo planas*

Eksperimentinis bandymo planas atrodo taip:

*1 diena*

Atskirai nustatoma ir užrašoma kiekvieno gyvūno masė. Ant kiekvienos ausies išorinės pusės užlašinama 25 µl atitinkamai atskiesto bandomosios medžiagos tirpalo, vien tik nesiklio arba teigiamo poveikio kontrolinės medžiagos (prireikus).

*2 ir 3 dienos*

Kartojama 1 dieną daryta procedūra.

*4 ir 5 dienos*

Jokio veikimo.

*6 diena*

Užrašoma kiekvieno gyvūno masė. Į visų pelių uodegos veną suleidžiama 250 µl valgomosios druskos ir fosfatinio buferio tirpalo (PBS), turinčio 20 µCi (7,4e + 8 Bq) <sup>3</sup>H-metiltimidino. Galima suleisti 250 µL PBS, turinčio 2 µCi (7,4e + 7 Bq) <sup>125</sup>I-jododeoksiuridino ir 10–5 mol/l fluorodeoksiuridino.

Po penkių valandų gyvūnai numarinami. Drenuojamieji ausų limfmazgiai išspjaunami iš kiekvienos ausies ir kiekvienos bandymo grupės išpjovos sudedamos į PBS (jungtinio apdoravimo grupės metodas); taikant kitą metodą, galima išpjauti atskirų gyvūnų limfmazgius ir kiekvieno gyvūno atskirai sudėti į PBS (atskiro gyvūnų apdoravimo metodas). Limfmazgių identifikavimo ir nekroskopijos aprašymą bei schemas galima rasti 10 nuorodos I priede.

1.3.3.2. *Ląstelių suspensijos ruošimas*

Ruošiama jungtinio apdoravimo grupių arba atskirų gyvūnų poros limfmazgių ląstelių suspensija (LNC), švelniai mechaniškai susmulkinant per 200 µm 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 <sup>3</sup>H, arba tiesiai į mėgintuvėlius gama impulsams skaičiuoti, kai reikia nustatyti <sup>125</sup>I.

1.3.3.3. *Ląstelių proliferacijos nustatymas (radioaktyviųjų junginių patekimas)*

<sup>3</sup>H-metiltimidino patekimas matuojamas skaičiuojant β scintiliacijas kaip skilimų skaičių per minutę (DPM). <sup>125</sup>I-jododeoksiuridino patekimas matuojamas skaičiuojant <sup>125</sup>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.

1.3.3.4.2. *Kūno masė*

Kaip nurodyta 1.3.3.1 skirsnyje, atskirai kiekvieno gyvūno masė nustatoma bandymo pradžioje ir po numatyto gyvūno numarinimo.

#### 1.3.4. **Rezultatų apskaičiavimas**

Rezultatai išreiškiami kaip dirginimo rodiklis (Stimulation Index – SI). Taikant jungtinio apdoravimo 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 apdoravimo 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 rėžius (8) (12) (13). Tačiau tyrėjas turi būti pasirošęs 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  $\geq 3$ , 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 gimininga 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. **BANDYMO ATASKAITA**

Ataskaitą turi sudaryti ši informacija:

Bandomoji medžiaga:

- tapatumas (pvz., CAS numeris, jei yra; grynumas; žinomos priemaišos; partijos numeris);
- fizikinė būsena ir fizikinės ir cheminės savybės (pvz., lakumas, stabilumas, tirpumas);
- jei mišinys, jo sudėtis ir komponentų procentinė dalis.

Nešiklis:

- tapatumo duomenys [grynumas; koncentracija (jei tinka); naudojamas tūris];
- nešiklio pasirinkimo pagrindimas.

Bandomo gyvūnai:

- naudota pelių veislė;
- gyvūno mikrobiologinė būsena, 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 bandymo rezultatus, jei bandymas 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 numarinimo 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;
- toksinio poveikio 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., Loveless, 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.
- 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 EC<sub>3</sub> 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.43. NEUROTOKSIŠKUMO GRAUŽIKAMS BANDYMAS

## 1. METODAS

Šis metodas atitinka OECD TG 424 (1997).

Šis bandymo metodas buvo sukurtas gauti informacijai, kuri yra būtina norint patvirtinti arba papildomai apibūdinti galimą cheminių medžiagų neurotoksinį poveikį suaugusiems gyvūnams. Šį metodą galima derinti su egzistuojančiais bandymo metodais, darant kartotinės dozės toksiškumo bandymus, arba daryti atskirą bandymą. Rekomenduojama susipažinti su OECD neurotoksiškumo bandymo strategijos ir metodų vadovu (1), kuris padėtų planuoti bandymus, pagrįstus šiuo bandymo metodu. Šis vadovas yra ypač reikalingas, kai rengiamasi daryti šiame metode rekomenduotų įprastų stebėjimų ir bandymo metodikų pakeitimus. Vadovas buvo parengtas norint palengvinti kitų bandymo metodikų, taikytinų konkrečiomis aplinkybėmis, pasirinkimą.

Šis metodas neskirtas įvertinti neurotoksiškumą vystymuisi.

## 1.3.4. ĮVADAS

Vertinant cheminių medžiagų toksines savybes, svarbu atsižvelgti į neurotoksiškumo galimybę. Jau kartotinės dozės bandymų metode sisteminiam toksiniam poveikiui nustatyti vykdomi galimo neurotoksiškumo stebėjimai. Šis bandymo metodas gali būti taikomas planuojant bandymą, kuris leistų gauti papildomos informacijos arba patvirtinti neurotoksinį poveikį, pastebėtą kartotinės dozės sisteminio toksiškumo bandymuose. Tačiau nagrinėjant galimą tam tikrų cheminių medžiagų klasių neurotoksiškumą, gali būti prieita prie išvados, kad šios medžiagos galėtų būti tinkamiau įvertintos taikant šį metodą, kai neturima išankstinių duomenų apie galimą neurotoksiškumą, kurie būtų gauti vykdant kartotinės dozės sisteminio toksiškumo bandymus. Tai galėtų būti, pvz.:

- neurologinių požymių arba neuropatologinių pažeidimų stebėjimas, darant kitus nei kartotinės dozės sisteminio toksiškumo bandymus; arba
- struktūros panašumų buvimas arba kita informacija, kuri leistų medžiagas susieti su kitomis neurotoksiškoms 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 neurotoksinį poveikį.

Anksčiau neurotoksiškumas buvo prilyginamas neuropatijai, esant neuropatologiniams pažeidimams arba neurologinių funkcijų sutrikimams, pvz., konvulsijos, paralyžius arba drebulys. Nors neuropatija yra svarbus neurotoksiškumo pasireiškimas, dabar paaiškėjo, kad yra daug kitų toksinio poveikio nervų sistemai požymių (pvz., motorinės koordinacijos netekimas, jutimo trūkumai, mokymosi ir atminties sutrikimai), kurių galima nepastebėti darant neuropatologinius arba kitų tipų bandymus.

Šis neurotoksiškumo bandymo metodas skirtas nustatyti pagrindinį neurobihevioristinį ir neuropatologinį poveikį suaugusiems graužikams. Nors poveikis elgesiui gali rodyti neigiamą įtaką organizmui ir tuo atveju, kai morfologinių pakitimų nėra, ne visi elgesio pakitimai yra būdingi nervų sistemai. Taigi visus pastebėtus pakitimus reikėtų įvertinti kartu su susijusiais histopatologiniais, hematologiniais arba biocheminiais duomenimis ir kitų sisteminio toksinio poveikio tipų duomenimis. Šiam metodui numatytus bandymus neurotoksiniam poveikiui apibūdinti ir kiekybiškai įvertinti sudaro specifinės histopatologinio ir elgesio įvertinimo metodikos, kurias papildomai gali patvirtinti elektrofiziologiniai ir (arba) biocheminiai tyrimai (1) (2) (3) (4).

Neurotoksinės medžiagos gali veikti įvairias nervų sistemos vietas ir įvairiais veikimo mechanizmais. Kadangi jokių vienu bandymų rinkiniu negalima išsamiai įvertinti visų medžiagų neurotoksiškumo, gali tekti taikyti kitus *in vivo* arba *in vitro* bandymus, atitinkančius pastebėtą arba numatomą neurotoksiškumo tipą.

Be to, šis bandymo metodas gali būti taikomas atsižvelgiant į rekomendacijas, pateiktas OECD neurotoksiškumo bandymo strategijos ir metodų vadove (1), siekiant parengti bandymus, skirtus papildomai apibūdinti dozės ir reakcijos santykį arba padidinti jo kiekybinio įvertinimo jautrumą, kad būtų galima geriau įvertinti nepastebėto neigiamo poveikio ribą arba pateikti neginčijamų įrodymų apie žinomus arba spėjamus

cheminės medžiagos keliamus pavojus. Pvz., galima parengti bandymus neurotoksiškumo mechanizmui (-ams) identifikuoti ir įvertinti arba papildyti duomenis, kurie jau buvo gauti taikant bazines elgesio ir neuropatologinių stebėjimų metodikas. Darant tokius bandymus nereikia pakartotinai gauti duomenų, kurie gauti taikant šiame metode rekomenduotas etalonines metodikas, jei tokie duomenys jau yra ir nėra laikomi būtinais tyrimo rezultatams aiškinti.

Šis neurotoksiškumo bandymas, daromas atskirai arba kartu su kitais bandymais, suteikia informacijos, kuri leidžia:

- nustatyti, ar nervų sistema yra visam laikui arba grįžtamai paveikta bandomąja chemine medžiaga;
- papildomai apibūdinti nervų sistemos pakitimus, susijusius su cheminės medžiagos veikimu, ir suprasti veikiančio mechanizmo esmę;
- nustatyti dozės ir reakcijos bei laiko ir reakcijos santykius, kad būtų galima įvertinti nepastebėto neigiamo poveikio ribą (kuri gali būti naudojama nustatant cheminės medžiagos saugos kriterijus).

Taikant šį bandymo metodą, bandomoji medžiaga duodama per virškinamąjį traktą. Kiti medžiagos davimo būdai (pvz., per odą arba per kvėpavimo takus) gali būti tinkamesni ir gali tekti keisti rekomenduojamas metodikas. Davimo būdo pasirinkimas priklauso nuo žmonių sąlyčio su medžiaga aplinkybių ir turimos informacijos apie toksikologiją ir kinetiką.

## 1.2. APIBRĖŽTYS

**Neigiamas poveikis** – bet koks su veikimu medžiaga susijęs pakitimas, palyginti su pamatine verte, mažinantis organizmo gebą išgyventi, daugintis arba prisitaikyti prie aplinkos.

**Dozė** – skirtas bandomosios medžiagos kiekis. Dozė išreiškiama bandomosios medžiagos mase bandomojo gyvūno masės vienetui (pvz., mg/kg) arba kaip pastovios koncentracijos pašare vertės (ppm).

**Dozavimas** – bendrasis terminas dozei, jos davimo dažnumui ir trukmei apibūdinti.

**Neurotoksiškumas** – nervų sistemos struktūros arba funkcijos neigiamas pakitimas dėl veikimo chemine, biologine arba fizikine medžiaga.

**Neurotoksiška medžiaga** – bet kuri cheminė, biologinė arba fizikinė medžiaga, galinti sukelti neurotoksinį poveikį.

**NOAEL** – nepastebėto neigiamo poveikio ribos santrumpa, tai yra didžiausia dozė, nesukelianti su veikimu susieto neigiamo poveikio.

## 1.3. BANDYMO METODO PRINCIPAS

Bandomoji cheminė medžiaga duodama kelioms laboratorinių graužikų grupėms per virškinamąjį traktą, naudojant kelias dozės koncentracijos vertes. Paprastai tenka duoti kartotines dozes ir dozavimo režimas gali būti 28 parų, pusiau lėtinis (90 parų) arba lėtinis (1 metai arba ilgiau). Be to, šiam bandymo metodui parengtos metodikos gali būti taikomos darant ūmaus neurotoksiškumo bandymą. Gyvūnai bandomi siekiant aptikti arba apibūdinti elgesio ir (arba) neurologines anomalijas. Kiekvienu stebėjimo laikotarpiu įvertinami įvairūs elgesio, kuriam neurotoksiškos medžiagos galėtų daryti įtaką, aspektai. Pasibaigus bandymui, kiekvienos grupės kiekvienos lyties gyvūnų pogrupio gyvūnams daroma perfuzija *in situ* ir ruošiami bei tiriami galvos bei stuburo smegenų ir periferiniai nervų preparatai.

Kai daromas atskiras (stand-alone) bandymas neurotoksiškumui aptikti arba neurotoksiniam poveikiui apibūdinti, kiekvienos grupės gyvūnai, kurie nebuvo panaudoti perfuzijai ir vėlesniam histopatologiniam tyrimui (žr. 1 lentelę), gali būti naudojami darant specialius elgesio bandymo, neuropatologinius, neurocheminius arba elektrofiziologinius bandymus, kuriais galima būtų papildyti duomenis, gautus darant šiame bandymo metode numatytus tipinius bandymus (1). Šie papildomi bandymai gali būti ypač naudingi, kai praktiniai stebėjimai arba numatomas poveikis rodo specifinį cheminės medžiagos neurotoksiškumo tipą arba veikiamą organą. Be to, likusieji gyvūnai gali būti naudojami darant vertinimus, kurie yra numatyti taikant graužikų kartotinės dozės toksiškumo bandymų metodus.

Kai šis bandymo metodas vykdomas kartu su kitais bandymo metodais, reikia turėti pakankamą gyvūnų skaičių norint vykdyti abiem bandymams reikalingus stebėjimus.

#### 1.4. BANDYMO METODO APRAŠYMAS

##### 1.4.1. Gyvūnų rūšies pasirinkimas

Tinkamiausia graužikų rūšis yra žiurkės, nors galima naudoti kitas graužikų rūšis, jei toks naudojimas būtų pagrįstas. Paprastai naudojamos laboratorinės jaunu, suaugusių ir sveikų gyvūnų veislės. Patelės turi būti neturėjusios palikuonių ir neapvaisintos. Dozė paprastai pradedama duoti kiek įmanoma greičiau po atjungimo, ir būtų gerai, kad gyvūnui būtų ne daugiau kaip šešios savaitės, tačiau bet kuriuo atveju anksčiau nei gyvūnas sulaukia devynių savaičių. Vis dėlto, kai bandymas daromas kartu su kitais bandymais, šį amžiaus reikalavimą gali tekti keisti. Naudojamų gyvūnų masė ir vidutinė kiekvienos lyties masė bandymo pradžioje neturi skirtis daugiau kaip  $\pm 20\%$ . Kai prieš ilgalaikį bandymą daromas trumpalaikis kartotinės dozės bandymas, abiem bandymams turi būti naudojami tos pačios veislės ir šaltinio gyvūnai.

##### 1.4.2. Laikymo ir šėrimo sąlygos

Eksperimentinių gyvūnų patalpos temperatūra turėtų būti  $22\text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). 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  $12\text{ h}$  šviesos ir  $12\text{ h}$  tamsos sekai. Reikia kiek įmanoma sumažinti didelį neišsistinių triukšmą. Gyvūnams šerti tinka įprastas laboratorijoje naudojamas pašaras, neribojant geriamo vandens kiekio. Pašaro pasirinkimui gali turėti įtakos būtinybė tinkamai įmaišyti bandomąją medžiagą, duodant ją šiuo būdu. Gyvūnai narveliuose gali būti laikomi atskirai arba mažomis tos pačios lyties grupėmis.

##### 1.4.3. Gyvūnų ruošimas

Sveiki ir jauni gyvūnai atsitiktinai suskirstomi į bandomąją ir kontrolinę grupes. Narveliai išdėstomi taip, kad būtų kiek įmanoma sumažintas bet koks galimas poveikis dėl narvelio vietos. Gyvūnai paženklunami, kad juos būtų įmanoma identifikuoti, ir laikomi narveliuose mažiausiai penkias (5) paras prieš bandymo pradžią, kad galėtų priprasti prie laboratorinių sąlygų.

##### 1.4.4. Davimo būdas ir dozių ruošimas

Taikant šį bandymo metodą, bandomoji medžiaga duodama per virškinamąjį traktą. Duoti per virškinamąjį traktą galima naudojant zondą, su pašaru, su geriamuoju vandeniu arba duodant kapsules. Galima naudoti kitus davimo būdus (pvz., per odą arba per kvėpavimo takus), bet tada gali tekti keisti rekomenduojamas metodikas. Davimo būdo pasirinkimas priklauso nuo žmogaus sąlyčio su medžiaga ypatybių ir turimos informacijos apie toksikologiją ar kinetiką. Reikia pagrįsti davimo būdo pasirinkimą ir nurodyti dėl to daromus šio bandymo metodo procedūrų pakeitimus.

Prireikus bandomoji medžiaga ištirpinama arba suspenduojama tinkamame nešiklyje. Rekomenduojama iš pradžių apsvarstyti galimybę naudoti vandeninį tirpalą ar suspensiją, vėliau tirpalą ar emulsiją aliejuje (pvz., kukurūzų aliejuje) ir tik tuomet galimybę tirpinti kitame nešiklyje. Turi būti žinomos nešiklio toksinės savybės. Be to, reikėtų atsižvelgti į šias nešiklio charakteristikas: poveikį absorbcijai, pasiskirstymui, medžiagų apykaitai ir bandomosios medžiagos sulaikymui, dėl ko gali keistis bandomosios medžiagos cheminės savybės; poveikį maisto ar vandens suvartojimui arba gyvūnų įmitimui.

#### 1.5. BANDYMO EIGA

##### 1.5.1. Gyvūnų skaičius ir lytis

Darant atskirą bandymą kiekvienos dozės grupei ir kontrolinei grupei turi būti naudojama mažiausiai 20 gyvūnų (10 patelių ir 10 patinų) norint išsamiai įvertinti klinikinių ir funkcinių stebėjimų rezultatus. Baigus bandymą mažiausiai penkiems patinams ir penkioms patelėms iš šių 10 patinų ir 10 patelių daroma perfuzija *in situ* ir jie naudojami išsamiam neurohistopatologiniam tyrimui. Tais atvejais, kai neurotoksiškumo požymiai pasireiškia tik ribotam tam tikros dozės grupės gyvūnų skaičiui, reikėtų numatyti šiuos gyvūnus įtraukti į pasirinktųjų perfuzijai gyvūnų skaičių. Kai bandymas daromas kartu su kartotinės dozės toksiškumo bandymu, abiejų bandymų tikslams pasiekti turi būti naudojamas atitinkamas gyvūnų skaičius. Įvairiems bandymų deriniams reikalingas mažiausias gyvūnų skaičius grupėje pateiktas 1 lentelėje. Jei numatomi tarpiniai numarinimai arba planuojama sudaryti grupes poveikio grįžtamumui, jo išsilaikymui arba po apdoravimo vėluojančiam poveikiui stebėti, arba kai numatoma daryti papildomus stebėjimus, gyvūnų skaičius turėtų būti padidintas siekiant užtikrinti, kad būtų gyvūnų, reikalingų stebėjimams ir histopatologiniam tyrimui.

##### 1.5.2. Bandomosios ir kontrolinė grupės

Paprastai turi būti naudojamos mažiausiai trys skirtingų dozių grupės ir kontrolinė grupė, tačiau, jei įvertinus kitus duomenis nelaukiama poveikio esant kartotinei  $1\ 000\text{ mg/kg}$  kūno masės/parą dozei, galima daryti ribinį bandymą. Jei atitinkamų duomenų nėra, galima daryti intervalo nustatymo bandymą, siekiant palengvinti naudojamos dozės pasirinkimo kelią. Kontrolinės grupės gyvūnai prižiūrimi kaip ir medžiaga

gaunančių grupių gyvūnai, išskyrus tai, kad jie neveikiami bandomąja medžiaga. Jei duodant bandomąją medžiagą naudojamas nešiklis, kontrolinė grupė turi gauti didžiausią naudojamą nešiklio tūrį.

#### 1.5.3. Patikimumo tikrinimas

Bandymą daranti laboratorija turi pateikti duomenis, įrodančius jos kompetenciją atlikti bandymą ir naudojamų metodikų jautrumą. Tokie duomenys turi patvirtinti įrodymus dėl sugebėjimo rasti ir prirėikus kiekybiškai įvertinti skirtingų stebimų parametrų pakitimus, pvz., autonominių požymių, jutiminio aktyvumo, grybšnio jėgos ir motorinio aktyvumo. Informacija apie chemines medžiagas, kurios sukelia įvairių tipų neurotoksinį poveikį ir kurios galėtų būti naudojamos kaip teigiamo poveikio kontrolinės medžiagos, pateikta 2–9 nuorodose. Galima naudoti anksčiau gautus duomenis, jei nebus keičiami esminiai bandymo metodikų aspektai. Rekomenduojama periodiškai atnaujinti anksčiau gautus duomenis. Kiekvieną kartą, kai bandymus daranti laboratorija keičia kurį nors bandymo arba jo metodikų esminį elementą, reikėtų gauti naujų duomenų, kurie rodytų nekintamą metodikų jautrumą.

#### 1.5.4. Dozės pasirinkimas

Dozės koncentracijos vertes reikėtų pasirinkti atsižvelgiant į visus anksčiau gautus toksiškumo ir kinetinius duomenis apie bandomąją medžiagą arba giminingas medžiagas. Didžiausia dozė turėtų būti pasirinkta siekiant sukelti neurotoksinį poveikį arba aiškų sisteminių toksinį poveikį. Vėliau turėtų būti pasirinkta mažėjanti dozės koncentracijos seka siekiant parodyti kiekvieną su dozės dydžiu susietą reakciją ir nepastebėto neigiamo poveikio ribą (NOAEL), atitinkantį mažiausią dozę. Iš esmės turėtų būti nustatyti tokių dozių dydžiai, kad būtų įmanoma atskirti pirminį toksinį poveikį nervų sistemai ir su sisteminiu toksiškumu susietą poveikį. Paprastai pakanka nuo dviejų iki trijų dozių intervalų, ir dažnai gerai būtų naudoti ketvirtą bandymo grupę, norint naudoti labai didelius intervalus tarp dozių (pvz., daugiklis didesnis kaip 10). Jei yra patikimų duomenų apie žmogaus sąlytį su medžiaga, į juos irgi reikia atsižvelgti.

#### 1.5.5. Ribinis bandymas

Jei darant bandymą pagal šiame bandyme aprašytas metodikas su viena mažiausiai 1 000 mg/kg kūno masės/parą doze neurotoksinis poveikis nepastebimas arba jei toksinio poveikio nelaukiama, atsižvelgiant į turimus duomenis apie giminingos struktūros junginius, nėra nebūtina daryti visą bandymą, naudojant tris dozių koncentracijas. Atsižvelgiant į numatomą žmogaus sąlytį su medžiaga gali tekti naudoti didesnes per virškinamąjį traktą duodamas ribinio bandymo dozes. Kalbant apie kitus davimo būdus, pvz., per kvėpavimo takus arba veikimą per odą, bandomosios medžiagos fizikinės ir cheminės savybės dažnai gali apibrėžti didžiausią pasiekiamą veikimo koncentraciją. Darant ūmaus poveikio per virškinamąjį traktą bandymą ribinio bandymo dozė turi būti mažiausiai 2 000 mg/kg.

#### 1.5.6. Dozavimas

Gyvūnai gauna bandomosios medžiagos dozę kasdien, septynias dienas per savaitę, ne trumpiau kaip 28 paras; penkių parų dozės režimas arba trumpesnė veikimo trukmė turi būti pagrįsti. Kai bandomoji medžiaga duodama per zondą, naudojamas skrandžio zondas arba tinkamas intubacinis vamzdelis. Didžiausias gyvūnui duodamas vienkartinis skysčio tūris priklauso nuo bandomo gyvūno dydžio. Tūris neturėtų būti didesnis kaip 1 ml/100 g kūno masės. Tačiau vandeninių tirpalų atveju galima duoti 2 ml/100 g kūno masės. Išskyrus dirginančias arba ėsdinančias medžiagas, kurios esant didesnei koncentracijai turi 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 bandymą daromas kartotinės dozės bandymas, darant abu bandymus turi būti naudojamas panašus pašaras. Jei darant ūmaus toksiškumo bandymus neįmanoma duoti vienkartinę dozę, ji gali būti duodama mažesnėmis dalimis ne ilgiau kaip per 24 h.

### 1.6. STEBĖJIMAI

#### 1.6.1. Stebėjimų ir tyrimų dažnumas

Darant kartotinės dozės bandymus, stebėjimo laikotarpis turi atitikti dozavimo laikotarpį. Darant ūmaus toksiškumo bandymus, stebima 14 parų po medžiagos davimo. Pagalbinių grupių gyvūnai, kurie negauna bandomosios medžiagos pasibaigus veikimo laikotarpiui, irgi turi būti stebimi tokį laikotarpį.



Stebėjimai turi būti daromi pakankamu dažniu siekiant kiek įmanoma padidinti tikimybę aptikti bet kokią elgesio nukrypimą ir (arba) neurologines anomalijas. Reikėtų stebėti kasdien vienodu laiku, atsižvelgiant į didžiausio laukiamo poveikio pasireiškimo laiką po medžiagos davimo. Klinikinių stebėjimų ir funkcinių tyrimų dažnis apibendrintas 2 lentelėje. Jei ankstesniuose bandymuose gauti kinetiniai duomenys rodo, kad stebėjimų, tyrimų arba stebėjimų po tyrimų laikas turi būti kitas, reikėtų patvirtinti kitą laiko grafiką didžiausiam informacijos kiekiui gauti. Padaryti grafiko pakeitimai turi būti pagrįsti.

#### 1.6.1.1. *Bendrosios sveikatos būklės ir gaištamumo ar liguistumo stebėjimas*

Visi gyvūnai turi būti bent kartą per dieną apžiūrėti jų sveikatos būklei nustatyti ir bent du kartus per dieną liguistumui ir gaištamumui nustatyti.

#### 1.6.1.2. *Išsamūs klinikiniai stebėjimai*

Nuodugniai turi būti apžiūrimi visi šiam tikslui atrinkti gyvūnai (žr. 1 lentelę) – kartą prieš pirmą veikimą medžiaga (kad būtų galima daryti to paties gyvūno palyginimus) ir vėliau skirtingais intervalais, atsižvelgiant į bandymo trukmę (žr. 2 lentelę). Pagalbinių sveikstančių gyvūnų grupių nuodugni klinikinė apžiūra turi būti daroma baigiantis pasveikimo laikotarpiui. Nuodugni klinikinė apžiūra daroma ne narvelyje, bet standartiška įrengtoje vietoje. Stebėjimų rezultatai turi būti kruopščiai užrašyti, naudojant įvertinimo balais sistemas, kurias sudaro kiekvienos apžiūros matavimų kriterijai arba įvertinimo balais skalės. Bandymų laboratorija turi aiškiai apibrėžti taikomus kriterijus arba balų skales. Reikia stengtis užtikrinti, kad bandymo sąlygų skirtumai būtų kiek įmanoma mažesni (išskyrus pagal metodiką susietas su apdorojimu) ir apžiūras darytų patyrę specialistai, kurie nežinotų apie faktinį apdorojimą.

Rekomenduojama apžiūras daryti struktūriniu būdu, kai darant kiekvieną apžiūrą kiekvienam gyvūnui sistemingai taikomi aiškiai apibrėžti kriterijai (įskaitant normalaus „intervalo“ apibrėžimą). „Normalus intervalas“ turi būti tinkamai dokumentuojamas. Turi būti užrašyti visi pastebėti požymiai. Be to, visais įmanomais atvejais turi būti užrašytas pasireiškiančių požymių mastas. Klinikiniai stebėjimai turi apimti odos, kailio, akių, gleivinių, sekrecijų ir ekskrecijų dažnį ir autonominių aktyvumą (pvz., ašarojimą, plaukų pašiaušimą, vyzdžių dydį, neįprastą kvėpavimą ir (arba) kvėpavimą per burną, visus neįprastus šlapinimosi arba tuštinimosi požymius, šlapimo išblukimą), tačiau neapsiriboti vien tuo.

Turi būti pažymėta bet kokia neįprasta reakcija, susijusi su kūno padėtimi, aktyvumo lygiu (pvz., naudojimosi tipiniu plotu sumažėjimas arba padidėjimas) ir judesių koordinacija. Užrašomi eisenos (pvz., krypuojanti eisena, ataksija), laikysenos (pvz., kuprojimasis) ir reakcijos į priežiūrą, apgyvendinimą arba kitus aplinkos dirgiklius pakitimai, taip pat kloninių arba toninių judesių, traukulių arba drebulio buvimas, stereotipinis elgesys (per dažnas kūno prisžiūrėjimas, neįprasti galvos judesiai, nuolatinis sukimasis ratu) arba keistas elgesys (pvz., kandžiojimas arba per didelis laišymasis, savęs žalojimas, vaikščiojimas atbulomis, vokalizacija) arba agresija.

#### 1.6.1.3. *Funkciniai bandymai*

Visiems šiam tikslui atrinktiems gyvūnams dar daromi į nuodugnius kliniskus stebėjimus panašūs funkciniai bandymai vieną kartą prieš paveikimą bandomąja medžiaga ir dažnai vėliau (žr. 1 lentelę). Be to, funkcinių bandymų dažnumas priklauso nuo bandymo trukmės (žr. 2 lentelę). Be 2 lentelėje nustatytų stebėjimo laikotarpių, turėtų būti daromi funkciniai pagalbinių grupių sveikimo stebėjimai kiek įmanoma prieš pat numatytą numarinimą. Funkcinius bandymus turi sudaryti jutiminio aktyvumo bandymai įvairių dirgiklių atžvilgiu [pvz., garsinių, regėjimo ir proprioceptinių dirgiklių (5) (6) (7)], galūnių grybšnio jėgos įvertinimas (8) ir motorinio aktyvumo įvertinimas (9). Motorinis aktyvumas matuojamas naudojant mechanizuotą įtaisą, kuriuo galima nustatyti aktyvumo didėjimą ir mažėjimą. Jei naudojama kita apibrėžta sistema, ji turi būti kiekybinio įvertinimo sistema ir turi būti įrodytas jos jautrumas ir patikimumas. Kiekvienas įtaisas tikrinamas siekiant užtikrinti jų patikimumą bėgant laikui ir įtaisų tarpusavio suderinamumą. Papildomos išsamios informacijos apie metodus pateikta atitinkamose nuorodose. Jei nėra duomenų (pvz., informacijos apie struktūros ir aktyvumo santykį, epidemiologinių duomenų, kitų toksikologinių tyrimų), kurie rodytų galimą neurotoksiškumą, reikėtų numatyti įtraukti labiau specializuotus jutimines ir motorines funkcijas arba mokymosi ir atminties tyrimus šiam poveikiui išsamiau ištirti. Daugiau informacijos apie specializuotus tyrimus pateikta (1).

Išimtiniais atvejais funkcinių tyrimų su gyvūnais galima nedaryti, jei gyvūnams pasireiškia tokio laipsnio toksikumo požymiai, kad tai labai trukdytų atlikti funkcinių tyrimų. Sprendimas neįtraukti gyvūnų į funkcinių tyrimų turi būti pagrįstas.

#### 1.6.2. **Kūno masė ir pašaro ar vandens suvartojimas**

Jei bandymai vyksta mažiau kaip 90 parų, visi gyvūnai turi būti sveriami mažiausiai kartą per savaitę, be to, mažiausiai kas savaitę matuojamas pašaro suvartojimas (vandens suvartojimas, kai bandomoji medžiaga duodama su vandeniu). Darant ilgalaikius bandymus, visi gyvūnai sveriami mažiausiai kartą per savaitę pirmąsias 13 savaitių ir vėliau mažiausiai kas 4 savaites. Pašaro suvartojimas matuojamas (vandens suvartojimas,

kai bandomoji medžiaga duodama su vandeniu) mažiausiai kartą per savaitę pirmąsias 13 savaitių ir vėliau maždaug kas tris mėnesius, išskyrus kai sveikatos būklė arba kūno masės kitimas reikalauja daryti kitaip.

#### 1.6.3. Oftalmologiniai tyrimai

Jei bandymas trunka ilgiau kaip 28 paras, prieš bandomosios medžiagos davimą ir pasibaigus bandymui būtina ištirti visų gyvūnų arba bent vieno didelės dozės grupės ir kontrolinės grupės gyvūno akis, naudojant oftalmoskopą arba lygiavertį tinkamą prietaisą. Jei nustatomi akių pakitimai arba jei klinikiniai požymiai rodo oftalmologinio tyrimo būtinumą, turi būti ištirti visi gyvūnai. Darant ilgalaikius bandymus, akys tiriamos po 13 savaitių. Oftalmologinių tyrimų daryti nebūtina, jei šie duomenys yra gauti darant kitus panašios trukmės ir panašaus dydžio dozių bandymus.

#### 1.6.4. Hematologiniai ir klinikiniai biocheminiai tyrimai

Kai neurotoksiškumo bandymas daromas kartu su kartotinės dozės sisteminio toksiškumo bandymu, hematologiniai tyrimai ir klinikiniai biocheminės analizės daromos taip, kaip nurodyta atitinkamame sisteminio toksiškumo bandymo metode. Ėminius reikia imti taip, kad būtų kiek įmanoma sumažintas bet koks neurologinis poveikis elgesiui.

#### 1.6.5. Histopatologiniai tyrimai

Turi būti planuojamas neuropatologinis tyrimas, siekiant papildyti ir išplėsti stebėjimų rezultatus, gautus bandymo *in vivo* stadijoje. Mažiausiai 5 kiekvienos lyties ar grupės gyvūnai (žr. 1 lentelę ir kitą pastraipą) fiksuojami *in situ*, taikant visuotinai pripažintus perfuzijos ir fiksavimo metodus (žr. 3 nuorodos 5 skyrių ir 4 nuorodos 50 skyrių). Turi būti užrašyti visi pastebėti dideli pakitimai. Kai bandymas daromas kaip atskiras bandymas neutoksiškoms medžiagoms atrinkti arba neurotoksiniam poveikiui apibūdinti, likusieji gyvūnai gali būti panaudoti specifiniams neurologinio elgesio (10) (11), neuropatologiniams (10) (11) (12) (13), neurocheminiams (10) (11) (14) (15) arba elektrofiziologiniams tyrimams (10) (11) (16) (17), kurie gali papildyti čia aprašytas metodikas ir tyrimus, arba padidinti histopatologiniuose tyrimuose naudojamų gyvūnų skaičių. Šie papildomi tyrimai yra ypač naudingi, kai praktiniai stebėjimai arba numatomas poveikis rodo specifinį neurotoksiškumo tipą arba veikiamą organą (2) (3). Be to, likusieji gyvūnai gali būti panaudoti įprastiems patologiniams įvertinimams, kaip aprašyta kartotinių dozių bandymų metode.

Visi į parafiną įlieti audinio mėginiai dažomi įprastu būdu, pvz., hematoksilinu ir eozinu (H&E), ir daromas mikroskopinis tyrimas. Jei pasireiškia arba įtariami periferinės neuropatijos požymiai, tiriami į plastiką įlieti periferinių nervų audinio ėminiai. Be to, klinikiniai požymiai gali nurodyti papildomas bandymo vietas arba poreikį naudoti specialias dažymo metodikas. Papildomos vietos, kurias reikėtų ištirti, aprašytos nuorodose (3) (4). Be to, konkreitiems patologinių pakitimų tipams parodyti gali būti naudojami atitinkami specialūs dažai (18).

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 sutorėjimų 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 neurotoksiškoms medžiagomis.

Informacija apie neuropatologinius pakitimus, paprastai atsirandančius dėl veikimo toksiškoms 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 pakitimų turinčių nervų sistemos sričių tyrimas. Visų dozių grupių galimai paveiktų sričių pjūviai koduojami ir atsitiktinai paskiriami tirti, nenurodant kodo. Turi būti užrašytas kiekvieno pažeidimo dažnumas ir sunkumas. Įvertinus visas visų dozių grupių sritis, kodą galima atskleisti ir daroma statistinė analizė dozės ir reakcijos santykiui įvertinti. Turi būti aprašyti kiekvieno pažeidimo įvairaus sunkumo laipsnio pavyzdžiai.



Neuropatologinių tyrimų rezultatai įvertinami atsižvelgiant į elgesio stebėjimus ir matavimus, be to, į duomenis, gautus darant ankstesnius ir lygiagrečius bandomosios medžiagos sisteminio toksiškumo bandymus.

## 2. DUOMENYS

### 2.1. REZULTATŲ APDOROJIMAS

Pateikiami atskirų gyvūnų duomenys. Papildomai visi duomenys apibendrinami ir suvedami į lenteles, kuriose kiekvienai bandymo arba kontrolinei grupei nurodomas gyvūnų skaičius, darant bandymą nugaišusių arba dėl gyvūnų gerovės priežasčių numarintų gyvūnų skaičius, toksiškumo požymių turinčių gyvūnų skaičius, stebimų toksiškumo požymių aprašymas, įskaitant bet kokio toksinio poveikio pradžios laiką, trukmę, tipą ir sunkumą, pažeidimų turinčių gyvūnų skaičius, įskaitant pažeidimo (-ų) tipą ir sunkumą.

### 2.2. REZULTATŲ ĮVERTINIMAS IR AIŠKINIMAS

Bandymo rezultatai įvertinami kaip neuropatologinio poveikio ir poveikio elgesiui (be to, neurocheminio arba elektrofiziologinio poveikio, jei vykdomi papildomi tyrimai) dažnumas, sunkumas ir jų koreliacija ir bet koks kitas pastebimas neigiamas poveikis. Jei įmanoma, skaitmeniniai rezultatai įvertinami taikant tinkamą ir visuotinai priimtą statistinį metodą. Statistiniai metodai pasirenkami rengiant bandymo planą.

## 3. ATASKAITOS RENGIMAS

### 3.1. BANDYMO ATASKAITA

Bandymo ataskaitoje turi būti pateikta ši informacija:

Bandomoji medžiaga:

- fizinė būsena (įskaitant izomerizavimą, grynumą ir fizikines ir chemines savybes);
- tapatumo duomenys.

Nešiklis (jei naudojamas):

- nešiklio pasirinkimo pagrindimas.

Bandomieji gyvūnai:

- naudota rūšis ir veislė;
- gyvūnų skaičius, amžius ir lytis;
- šaltinis, laikymo sąlygos, aklimatizavimas, maistas ir t. t.;
- kiekvieno gyvūno masė bandymo pradžioje.

Bandymo sąlygos:

- išsami informacija apie bandomosios medžiagos ar preparato ruošimą, jo dėjimą į maistą, gautą koncentraciją, preparato stabilumą ir vienalytiškumą;
- duodamos dozės specifikacija, įskaitant išsamią informaciją apie nešiklį, duodamos medžiagos turį ir fizikinį pavaldą;

- informacija apie bandomosios medžiagos davimo būdą;
- pasirinkto dozės dydžio pagrindimas;
- veikimo būdo ir trukmės pasirinkimo pagrindimas;
- bandomosios medžiagos koncentracijos pašare ar geriamajame vandenyje (ppm) perskaičiavimas į tikrąją dozę (mg/kg kūno masės/parą), jei tinka;
- išsami informacija apie maisto ir vandens kokybę.

#### Stebėjimo ir bandymo metodikos:

- išsami informacija apie kiekvienos grupės gyvūnų atranką į pogrupį perfuzijai daryti;
- išsami informacija apie vertinimo balais sistemas, įskaitant kiekvieno matavimo vykdant nuodugnius klinikinius stebėjimus kriterijus ir balų skales;
- išsami informacija apie funkcinis 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 numarinant;
- maisto ir vandens suvartojimas, jei tinka;
- reakcijos į toksinį poveikį duomenys pagal lytį ir dozės dydį, įskaitant toksiškumo požymius arba gaištumą;
- nuoduginių klinikinių stebėjimų tipas, sunkumas ir trukmė (pradžios laikas ir vėlesnė eiga) (nurodyti grįžtamumą arba negrįžtamumą);
- visų funkcinio bandymo rezultatų išsamus aprašymas;
- nekroskopijos rezultatai;
- išsamus visų turimų elgesio, neuropatologinių, neurocheminių arba elektrofiziologinių rezultatų aprašymas;
- absorbcijos ir medžiagos apykaitos duomenys, jei yra;
- statistinis rezultatų apdorojimas, jei daromas.

#### Rezultatų aptarimas:

- informacija apie dozės ir reakcijos santykį;
- ryšys su bet kokių 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.
- 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). Neuropathology as a screen for Neurotoxicity Assessment. *J. Amer. Coll. Toxicol.*, 10, p. 689–695.
- 13) Moser, V.C., Anthony, D.C., Sette, W.F. and MacPhail, R.C. (1992). Comparison of Subchronic Neurotoxicity of 2-Hydroxyethyl Acrylate and Acrylamide in Rats. *Fund. Appl. Toxicol.*, 18, p. 343–352.
- 14) O'Callaghan, J.P. (1988). Neurotypic and Gliotypic Proteins as Biochemical Markers of Neurotoxicity. *Eurotoxicol. Teratol.*, 10, p. 445–452.
- 15) O'Callaghan J.P. and Miller, D.B. (1988). Acute Exposure of the Neonatal Rat to Triethyltin Results in Persistent Changes in Neurotypic and Gliotypic Proteins. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 244, p. 368–378.

- 16) Fox, D.A., Lowndes, h.E. and Birkamper, G.G. (1982). Electrophysiological Techniques in Neurotoxicology. In: Nervous System Toxicology. Mitchell, C.L. ed. Raven Press, New York, p. 299–335.
- 17) Johnson, B.L. (1980). Electrophysiological Methods in neurotoxicity Testing. In: Experimental and Clinical Neurotoxicology. Spencer, P.S. and Schaumburg, h.H. eds., Williams and Wilkins Co., Baltimore/London, p. 726–742.
- 18) Bancroft, J.D. and Steven A. (1990). Theory and Praticce of Histological Techniques. Chapter 17, Neuro-pathological Techniques. Lowe, James and Cox, Gordon eds. Churchill Livingstone.

## 1 lentelė

## Mažiausias gyvūnų skaičius vienoje grupėje darant neurotoksiškumo bandymą atskirai arba kartu su kitais bandymais

	NEUROTOKSIŠKUMO BANDYMAS, DARYTAS KAIP:			
	atskiras bandymas	bandymas, daromas kartu su 28 parų bandymu	bandymas, daromas kartu su 90 parų bandymu	bandymas, daromas kartu su lėtinio toksiškumo bandymu
Bendras gyvūnų skaičius grupėje	10 patinų ir 10 patelių	10 patinų ir 10 patelių	15 patinų ir 15 patelių	25 patinai ir 25 patelės
Gyvūnų, atrinktų funkciniam tyrimui, įskaitant nuodugnius klinikinius stebėjimus, skaičius	10 patinų ir 10 patelių	10 patinų ir 10 patelių	10 patinų ir 10 patelių	10 patinų ir 10 patelių
Gyvūnų, atrinktų perfuzijai <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/pusiau lėtinio/lėtinio toksiškumo stebėjimui, hematologiniam, klinikiniam biocheminiam, histopatologiniam ir t. t. tyrimui, kaip nurodyta atitinkamose rekomendacijose, skaičius		5 patinai ir 5 patelės	10 patinų <sup>(1)</sup> ir 10 patelių <sup>(1)</sup>	20 patinų <sup>(1)</sup> ir 20 patelių <sup>(1)</sup>
Papildomi stebėjimai, jei reikia	5 patinai ir 5 patelės			

(<sup>1</sup>) Įskaitant penkis gyvūnus, atrinktus funkciniam bandymui ir nuodugniems klinikiniam stebėjimams, kurie yra neurotoksiškumo tyrimo dalis.

## 2 lentelė

**Klinikinių stebėjimų ir funkcinių tyrimų dažnumas**

Stebėjimų tipas		Bandymo trukmė			
		ūmus	28 parų	90 parų	lėtinis
Visi gyvūnai	Bendroji sveikatos būklė	kasdien	kasdien	kasdien	kasdien
	Gaištamumas/ liguistumas	du kartus per dieną	du kartus per dieną	du kartus per dieną	du kartus per dieną
Gyvūnai, atrinkti funkciniam stebėjimams	Nuodugnūs klinikiniai stebėjimai	— prieš pirmą veikimą — po 8 h nuo dozės davimo, didžiausio numatomo poveikio 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 tyrimai	— prieš pirmą veikimą — po 8 h nuo dozės davimo, didžiausio numatomo poveikio momentu — 7 ir 14 parų po dozės davimo	— prieš pirmą veikimą — ketvirtą apdorojimo savaitę, kuomet 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.44. SUGERTIS PER ODA, IN VIVO METODAS

## 1. METODAS

Šis bandymo metodas atitinka OECD TG 427 (2004).

## 1.1. ĮVADAS

Sąlytis su daugeliu cheminių medžiagų įvyksta iš esmės per odą, o atliekant didesnę dalį toksikologinių bandymų su laboratoriniais gyvūnais, medžiagos dozė duodama per virškinamąjį traktą. Šioje rekomendacijoje aprašytas *in vivo* sugerties per odą bandymas užtikrina sąsają, kuri yra būtina bandymų per virškinamąjį traktą duomenims ekstrapoliuoti, kai daromi sąlyčio per odą saugos įvertinimai.

Medžiaga prieš pasiekdama apytaką turi kirsti daug odos ląstelių sluoksnių. Daugelio medžiagų greitį lemia iš negyvų ląstelių sudarytas *stratum corneum*. Skvarba per odą priklauso nuo cheminės medžiagos lipofiliškumo ir epidermio išorinio sluoksnio storio, be to, nuo kitų veiksnių, pavyzdžiui, medžiagos molekulinės masės ir koncentracijos. Apskritai, žiurkių ir triušių oda yra pralaidesnė palyginti su žmogaus oda, o jūrų kiaulyčių ir beždžionių odos pralaidumas yra panašesnis į žmogaus odos pralaidumą.

Sugerties per odą matavimo metodai gali būti suskirstyti į dvi kategorijas; *in vivo* ir *in vitro*. *In vivo* metodu galima gauti naudingos informacijos apie įvairių laboratorinių rūšių sugertį per odą. Neseniai buvo sukurti *in vitro* metodai. Juose taikoma medžiagos pernaša per visą gyvūnų arba žmogaus odos sluoksnio storį arba jo dalį į indą su skysčiu. *In vitro* metodas yra aprašytas kaip atskiras bandymo metodas (1). Rekomenduojama naudotis OECD rekomendaciniu dokumentu dėl sugerties per odą bandymų vykdymo (2), kuris padėtų pasirinkti konkrečiam atvejui tinkamiausią metodą, kadangi šiame dokumente pateikta daugiau informacijos apie abiejų *in vivo* ir *in vitro* metodų tinkamumą.

Šiame dokumente aprašytu *in vivo* metodu galima nustatyti bandomosios medžiagos skvarbą per odą į sisteminę dalį. Metodas yra plačiai taikomas daug metų (3) (4) (5) (6) (7). Nors daugeliu atveju gali tikti *in vitro* sugerties per odą bandymai, būna atvejų, kai reikiamus duomenis galima gauti tik atliekant *in vivo* bandymą.

Prie *in vivo* metodo pranašumų reikėtų priskirti tai, kad jame naudojama fiziologiniu ir medžiagų apykaitos požiūriu vientisa sistema, naudojamos daugumai toksiškumo bandymų įprastos rūšys, be to, metodą galima modifikuoti pritaikant jį kitoms rūšims. Trūkumai: gyvūnų naudojimas, būtinybė naudoti žymėtąsias medžiagas, kad rezultatai būtų patikimi, sunkumai nustatant ankstyvąjį sugerties tarpsnį ir rekomenduojamos rūšies (žiurkės) bei žmogaus odos pralaidumo skirtumai. Gyvūnų oda paprastai yra pralaidesnė, todėl sugertis per žmogaus odą gali būti pervertinta (6) (8) (9). Šarminių (ardančių) medžiagų nereikėtų tirti su gyvais gyvūnais.

## 1.2. APIBRĖŽTYS

**Nesugertoji dozė** – atitinka dozę, nuplaunamą po veikimo nuo odos paviršiaus, ir visą dozę, esančią ant nesandaraus apdangalo, įskaitant visą dozę, kuri, kaip įrodoma, išgaravo nuo odos paviršiaus veikimo laikotarpiu.

**Sugertoji dozė (*in vivo*)** – sudaro šlapime, narvelio plovimo vandenyje, išmatose, iškvėptame ore (jei matuojamas), kraujyje, audiniuose (jei imami) ir likusioje kūno dalyje esanti dozė, pašalinus uždėjimo vietas odą.

**Sugeriamoji dozė** – atitinka ant odos arba odoje po plovimo esančią dozę.

## 1.3. BANDYMO METODO PRINCIPAS

Viena arba kelios tinkamo dydžio bandomosios medžiagos (geriausia su žymėtaisiais atomais) dozės dedamos ant nuskustos gyvūnų odos tokiu pavidalu, kuris atitiktų tipinį preparato naudojimą. Nustatytą laiką bandomasis preparatas laikomas ant odos, uždengtas tinkamu apdangalu (nesandariu, pusiau sandariu arba sandariu), kad būtų išvengta bandomojo preparato nurijimo. Pasibaigus veikimo laikui, apdangalas nuimamas, oda plaunama atitinkamu plovikliu, apdangalas bei plovimo medžiagos paliekamos analizei ir uždedamas naujas apdangalas. Gyvūnai prieš veikimą, veikimo metu ir jam pasibaigus laikomi atskiruose medžiagų apykaitai matuoti skirtuose narveliuose ir visą šį laiką analizei renkamos išskyros ir iškvėptas oras. Iškvėpto oro galima

nerinkti, kai yra pakankamai informacijos, kad lakiųjų radioaktyviųjų apytakos produktų susidaro mažai arba jų nesudaro. Kiekviename bandyme paprastai naudojamos kelios gyvūnų grupės, veikiamos bandomuoju preparatu. Viena grupė numarinama pasibaigus veikimo laikotarpiui. Kitos grupės numarinamos vėliau pagal nustatytą grafiką (2). Pasibaigus bandinių ėmimo laikui, numarinami likusieji gyvūnai, analizei surenkamas kraujas, medžiagos uždėjimo vieta išpaunama analizei atlikti, o kūnas analizuojamas bet kokiai neišsiskyrušiai 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.

##### 1.4.2. Gyvūnų skaičius ir lytis

Kiekvienas bandomasis preparatas tam tikrą nustatytą laikotarpį bandomas su atskira bent keturių vienos lyties gyvūnų grupe. Kiekviena gyvūnų grupė numarinama, praėjus skirtingam laiko tarpui, pvz., pasibaigus veikimo laikotarpiui (paprastai 6 arba 24 h) ir vėliau (pvz., po 48 ir 72 h). Jei yra duomenų, kad patinų ir patelių TOKSIŠKUMAS PER odą labai skiriasi, pasirenkama jautresnė lytis. Jei tokių duomenų nėra, galima naudoti bet kurią lytį.

##### 1.4.3. Laikymo ir šėrimo sąlygos

Patalpos, kurioje bandomi gyvūnai, temperatūra turi būti 22 °C ( $\pm$  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, partartina, 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 penkis paras, per kurias jie galėtų aklimatizuotis laboratorinėmis sąlygomis.

Pasibaigus aklimatizavimui ir maždaug 24 h iki dozavimo nuskutama visų gyvūnų oda pečių ir nugaros srityje. Pažeistos odos ir sveikos odos pralaidumo savybės skiriasi, todėl reikia stengtis nenutrinti odos. Po nuskutimo ir likus maždaug 24 h iki medžiagos uždėjimo ant odos (žr. 1.4.7 skirsnį) odos paviršius nuskustame plote plaunamas acetonu odos riebalams pašalinti. Papildomai plauti muilu ir vandeniu nerekomenduojama, kadangi bet koks muilo likutis galėtų skatinti bandomosios medžiagos sugertį. Plotas turi būti pakankamai didelis, kad būtų įmanoma patikimai apskaičiuoti sugertą bandomosios medžiagos kiekį vienam cm<sup>2</sup> odos, pageidautina ne mažesnis kaip 10 cm<sup>2</sup>. Tokį plotą įmanoma paruošti 200–250 g masės žiurkėms. Po paruošimo gyvūnai grąžinami į apykaitos matavimo narvelius.

##### 1.4.5. Bandomoji medžiaga

Bandomoji medžiaga – objektas, kurio skvarbos charakteristikas reikia tirti. Geriausia būtų naudoti bandomąją medžiagą su žymėtaisiais atomais.

##### 1.4.6. Bandomasis preparatas

Bandomosios medžiagos preparatas (pvz., grynas, skiestas arba bandomosios cheminės medžiagos turintis preparatas, kuris bus dedamas ant odos) turi atitikti preparatą (arba būti tikroviškas jo pakaitalas), su kuriuo gali įvykti žmonių arba kitų galimų tikslinių rūšių sąlytis. Visi nukrypimai nuo tikroviškų preparato naudojimo sąlygų turi būti pagrįsti. Prireikus bandomoji medžiaga tirpinama arba suspenduojama tinkamame tirpiklyje. Jei tirpiklis – ne vanduo, turi būti žinomos jo sugerties charakteristikos ir sąveika su bandomąja medžiaga.



#### 1.4.7. Uždėjimas ant odos

Odos paviršiuje apibrėžiama tam tikro paviršiaus ploto vieta medžiagai uždėti. Tuomet toje vietoje tolygiai uždedamas žinomas bandomo preparato kiekis. Šis kiekis paprastai turėtų būti panašus į kiekį, kurį žmonės gali gauti pe sąlytį su medžiaga, dažniausiai 1–5 mg/cm<sup>2</sup> kietosios medžiagos arba mažiau kaip 10 µl/cm<sup>2</sup> skysčio. Visas kitas dozes reikia pagrįsti numatomomis naudojimo sąlygomis, bandymo tikslais arba bandomojo preparato fizikinėmis charakteristikomis. Po uždėjimo apdorota vieta turi būti apsaugota nuo laižymo. Tipinio įtaiso pavyzdys pavaizduotas 1 paveiksle. Paprastai uždėjimo vieta apsaugoma nesandariu apdangalu (pvz., pralaidžiu nailono marlės apdangalu). Tačiau neribotų dozių taikymo atvejais uždėjimo vieta turėtų būti sandarinama. Jei dėl pusiau lakių medžiagų garavimo nepriimtina sumažėja regeneravimo laipsnis (žr. dar 1.4.10 skirsnio pirmą pastraipą), garantuojančią 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 sąlyčio su medžiaga trukme. Pasibaigus veikimo laikotarpiui, gyvūnai laikomi medžiagų apykaitos matavimo narveliuose iki jie numarunami pagal grafiką. Visą bandomo laikotarpį gyvūnai turi būti reguliariai stebimi siekiant nustatyti toksikumo požymius ir (arba) neįprastas reakcijas. Pasibaigus veikimo laikotarpiui, apdorotoji oda turi būti apžiūrinama siekiant nustatyti matomus dirginimo požymius.

Visą bandomo laikotarpį turi būti įmanoma medžiagų apykaitos matavimo narveliuose atskirai rinkti susikauptiančius šlapimą ir išmatas. Be to, turi būti įmanoma rinkti <sup>14</sup>C žymėtą anglies dioksidą ir lakiuosius <sup>14</sup>C žymėtus anglies junginius, kurie turi būti analizuojami, jei susidaro didelis jų kiekis (> 5 %). Šlapimas, išmatos ir sugerčiai (pvz., <sup>14</sup>C žymėto anglies dioksido ir lakiųjų <sup>14</sup>C junginių) naudoti skysčiai turėtų būti renkami atskirai iš kiekvienos grupės kiekvienu mėginio ėmimo laiku. Jei yra pakankamai informacijos apie tai, kad lakiųjų apykaitos produktų susidaro mažai arba jie išvis nesusidaro, galima naudoti atvirus narvelius.

Išmatos renkamos visą veikimo laikotarpį, iki 24 h nuo pradinio sąlyčio su oda ir vėliau kasdien iki eksperimento pabaigos. Nors paprastai pakanka trijų išmatų rinkimo laikotarpių, atsižvelgiant į numatytą bandomojo preparato paskirtį arba į turimus kinetinius duomenis, tyrimui gali būti numatyti tinkamesni arba papildomi laiko taškai.

Pasibaigus veikimo laikotarpiui, apsauginis įtaisas nuimamas nuo kiekvieno gyvūno ir laikomas atskirai analizei. Visų gyvūnų apdorotoji oda turi būti plaunama bent tris kartus plovimo priemone, naudojant tinkamus tamponus. Reikia stengtis neužteršti kitų kūno dalių. Plovimo priemonė turi atitikti įprastą higienai naudojamą priemonę, pvz., naudojamas vandeninis muilo tirpalas. Galiausiai oda išdžiovinama. Visi tamponai ir plovimo vandenys turi būti paliekami analizei. Prieš grąžinant gyvūnus, kurie priklauso grupėms, laikomoms vėlesniems bandomo etapams, į atskirus narvelius, ant jų apdorotos vietos uždedamas naujas jai apsaugoti skirtas apdangalas.

#### 1.4.9. Baigiamosios procedūros

Atskiri kiekvienos grupės gyvūnai numarunami 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 išskverbia į *stratum corneum*. Odos dalijimui palengvinti (po paskutinio odos plovimo ir gyvūno numaravimo) nuimami visi apsauginiai apdangalai. Žiurkės oda uždėjimo vietoje ir aplink ją esančios odos žiedas išpjaunamas ir prismeigiamas prie lentos. Lengvai spaudžiant ant odos paviršiaus uždedamas lipniosios juostos gabaliukas, kuris vėliau nuimamas kartu su *stratum corneum* dalimi. Kiti juostos gabaliukai dedami tol, kol juosta nustoja lipti prie odos paviršiaus, kai pašalinamas visas *stratum corneum*. Kiekvieno gyvūno visi juostų gabaliukai sudedami į vieną indą, į kurį pridama 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 numaravimo pagal grafiką, turi būti supilamas kartu su anksčiau surinktu šlapimu. Iš medžiagų apykaitos tyrimo narvelių surinkus išmatas po planinio numaravimo, narvelius ir jų gaudyklės reikia išplauti atitinkamu tirpikliu. Panašiu būdu turi būti analizuojama kita potencialiai užteršta įranga.

**1.4.10. Analizė**

Visuose bandymuose turi būti pasiektas atitinkamas regeneravimo laipsnis (t. y. vidutiniškai  $100 \pm 10\%$  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;
- 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  $\text{cm}^2$  bandomąja medžiaga veikiamos odos.

**3. ATASKAITOS PATEIKIMAS****3.1. BANDYMO ATASKAITA**

Į bandymo ataskaitą turi būti įtraukti protokole nustatyti reikalavimai, įskaitant naudotos sistemos pagrindimą, ir ją turi sudaryti šie punktai:

Bandomoji medžiaga:

- tapatumas [pvz., CAS numeris, jei žinomas; šaltinis; grynumas (radiocheminis grynumas); žinomos priemaišos; siuntos numeris];
- fizikinė būsena ir fizikinės bei cheminės savybės (pvz., pH, lakumas, tirpumas, stabilumas, molekulinė masė ir  $\log P_{ov}$ ).

Bandomasis preparatas:

- sudėtis ir naudojimo pagrindimas;
- išsami informacija apie bandomąjį preparatą, uždedamas kiekis, koncentracija, tirpiklis, stabilumas ir vienalytiškumas.

Bandomieji gyvūnai:

- naudota rūšis/veislė;

- skaičius, amžius ir lytis;
- šaltinis, laikymo sąlygos, pašaras ir t. t.;
- atskirų gyvūnų kūno masė bandymo pradžioje.

Bandymo sąlygos:

- informacija apie bandomojo preparato uždejimą (uždėjimo vieta, mėginių ėmimo metodai, sandarus/nesandarus apdangalas, tūris, ekstrahavimas, aptikimas);
- išsami informacija apie pašaro ir vandens kokybę.

Rezultatai:

- visi toksiškumo požymiai;
- sugerties duomenys (išreikšti kaip greitis, kiekis arba procentinė dalis), pateikiami lentelėse;
- suminiai per bandymą regeneruoti kiekiai;
- rezultatų aiškinimas, lyginimas su visais turimais bandomojo junginio sugerties per odą duomenimis.

Rezultatų aptarimas.

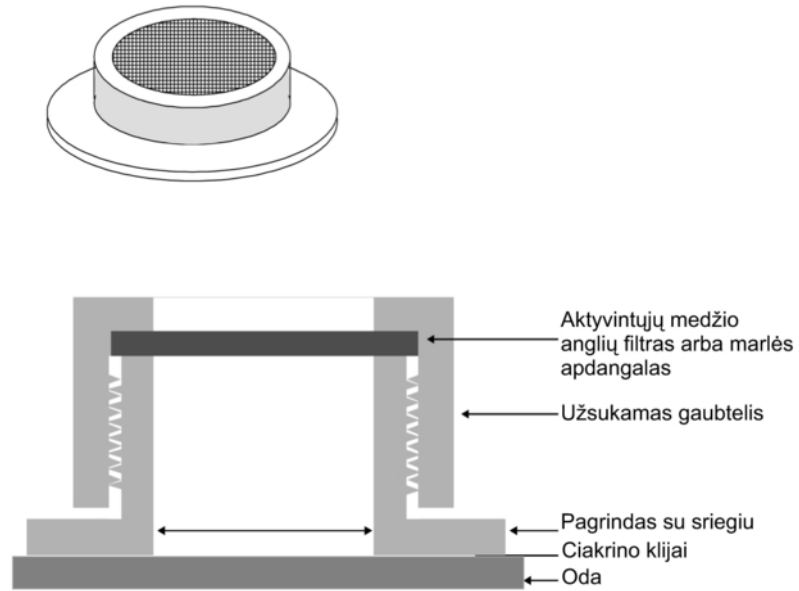
Išvados.

#### 4. NUORODOS

- 1) Testing Method B.45. Skin Absorption: *In vitro* Method.
- 2) OECD (2002). Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies. OECD, Paris.
- 3) ECETOC (1993) Percutaneous Absorption. European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals, Monograph No. 20.
- 4) Zendzian RP (1989) Skin Penetration Method suggested for Environmental Protection Agency Requirements. *J. Am. Coll. Toxicol.* 8(5), p. 829–835.
- 5) Kempainen 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.

## 1 paveikslas

Tipinio įtaiso, naudojamo uždėjimo ant odos vietai apibrėžti ir apsaugoti, atliekant *in vivo* sugerties per odą bandymus, konstrukcijos pavyzdys



## 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. Ji galima derinti su sugerties per odą *in vivo* metodu (1) arba taikyti atskirai. Rekomenduojama naudotis OECD rekomendaciniu dokumentu dėl sugerties per odą bandymų vykdymo (2), kuris padėtų planuoti šiuo metodu pagrįstus bandymus. Rekomendacinis dokumentas yra parengtas siekiant padėti pasirinkti tinkamas *in vitro* procedūras, skirtas taikyti konkrečiomis aplinkybėmis, kad būtų galima užtikrinti šiuo metodu gautų rezultatų patikimumą.

Metodai sugerčiai ir pernašai per odą matuoti gali būti suskirstyti į dvi kategorijas: *in vivo* ir *in vitro*. *In vivo* sugerties per odą metodai yra gerai žinomi ir farmakokinetinė informacija gaunama įvairioms gyvūnų rūšims. *In vivo* metodas yra atskirai aprašytas 1 nuorofoje. Be to, *in vitro* metodai daug metų yra naudojami sugerčiai per odą matuoti. Nors oficialūs šiame bandymo metode aprašytų *in vitro* metodų tinkamumo patvirtinimo bandymai nebuvo atlikti, 1999 m. OECD ekspertai sutarė, kad yra pakankamas kiekis įvertintų duomenų *in vitro* metodui patvirtinti (3). Papildomų išsamių duomenų, kurie konkrečiai pagrįstų šį patvirtinimą, įskaitant didelį tiesioginių *in vitro* ir *in vivo* metodų palyginamųjų duomenų skaičių, pateikta rekomendaciniame dokumente (2). Yra keletas monografijų, kuriose ši tema apžvelgiama ir išsamiai pagrindžiamas *in vitro* metodas (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12). *In vitro* metodais matuojama cheminių medžiagų difuzija į odą ir per odą į indą su skysčiu, kai galima naudoti negyvą odą tik difuzijai matuoti arba naudoti ką tik paruoštą, medžiagų apykaitos požiūriu veiklią odą difuzijai per odą ir medžiagų apykaitai matuoti. Tokie metodai visų pirma imti taikyti kaip atrankos metodai lyginant skirtinguose preparatuose esančių cheminių medžiagų tiekimą į odą ir per odą, be to, juos galima taikyti kaip naudingus modelius sugerčiai per žmonių odą įvertinti.

*In vitro* metodas gali tikti ne visuomet ir ne visoms cheminių medžiagų klasėms. Galbūt *in vitro* bandymo metodas tiktų pradiniam kokybiniam skverbties per odą įvertinimui. Tam tikrais atvejais gali tekti papildyti bandymą *in vivo* duomenimis. Reikėtų ieškoti informacijos rekomendaciniame dokumente (2) toliau tikslinti aplinkybes, kuriomis tiktų *in vitro* metodas. Papildomos išsamos informacijos sprendimui paremti pateikta (3).

Šiame metode pateikti bendrieji principai, kaip matuoti cheminės medžiagos sugertį ir pernašą per išpjautą odą. Galima naudoti daugelio žinduolių rūšių odą, įskaitant žmonių. Odos pralaidumo savybės nepakinta išpjovus ją iš kūno, kadangi pagrindinis difuzijos užtvaras yra negyvas *stratum corneum*; aktyvi cheminių medžiagų pernaša per odą nėra nustatyta. Yra įrodyta, kad, vykstant sugerčiai per odą, oda gali dalyvauti kai kurių cheminių medžiagų apykaitoje (6), tačiau šis procesas neapriboja faktinės sugertos dozės įsiskverbimo greičio, nors jis gali turėti įtakos į kraujo apytaką patenkančios medžiagos savybėms.

## 1.2. APIBRĖŽTYS

**Nesugertoji dozė** – atitinka dozę, nuplaunamą po veikimo nuo odos paviršiaus, ir visą dozę, esančią ant nesandarau 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, uždėdama ant odos bandinio, skiriančio du difuzijos kameros skyrius, paviršiaus. Esant apibrėžtomis sąlygoms cheminė medžiaga laikoma ant odos apibrėžtą laiką ir vėliau nuplaunama taikant atitinkamą plovimo procedūrą. Visą bandymą tam tikrais laiko tarpais imami rinktuvo skysčio mėginiai ir analizuojami cheminei medžiagai ir (arba) jos medžiagų apykaitos produktams nustatyti.

Kai naudojamos medžiagų apykaitos požiūriu aktyvios sistemos, bandomosios cheminės medžiagos medžiagų apykaitos produktai gali būti analizuojami taikant atitinkamus metodus. Prireikus po bandymo kiekybiškai nustatomas bandomosios cheminės medžiagos ir jos medžiagų apykaitos produktų pasiskirstymas.

Atitinkamomis sąlygomis, aprašytomis šiame metode ir rekomendaciniame dokumente (2), nustatytą laikotarpį matuojama bandomosios medžiagos sugertis, atliekant rinktuvo skysčio ir apdorotos odos analizę. Odoje likusi bandomoji medžiaga turi būti laikoma sugerta, išskyrus atvejus, kai galima įrodyti, kad sugertį galima nustatyti vien tik pagal rinktuvo skysčio vertes. Kitų sudėtinių dalių (nuo odos nuplautos ir odos sluoksnių viduje likusios medžiagos) analizė leidžia išsamiau įvertinti duomenis, įskaitant bandomosios medžiagos pasiskirstymą ir regeneravimo laipsnį.

Norint įrodyti bandymų laboratorijoje naudojamos bandymo sistemos veikimą ir patikimumą, reikia turėti su atitinkamomis etaloninėmis medžiagomis gautus rezultatus, kurie atitiktų literatūroje paskelbtus taikomo metodo rezultatus. Šį reikalavimą galima įvykdyti lygiagrečiai bandant atitinkamą etaloninę medžiagą (geriau tokią, kurios lipofilinės savybės mažai skiriasi nuo bandomosios medžiagos savybių) ir bandomąją medžiagą arba gauti anksčiau sukauptus tinkamus duomenis apie kelias skirtingų lipofilinių savybių etalones 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.

##### 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, anatinė vieta ir paruošimo metodas. Vienam bandomajam preparatui reikia pateikti bent keturių kartotinių bandymų priimtinus duomenis.

##### 1.4.4. ODOS PREPARATŲ VIENTISUMAS

Svarbu tinkamai paruošti odą. Netinkamai ruošiant galima pažeisti *stratum corneum*, todėl turi būti tikrinamas paruoštos odos vientisumas. Kai tiriama odos medžiagų apykaita, ką tik išpjauta oda turi būti naudojama kuo greičiau ir esant sąlygoms, apie kurias būtų žinoma, kad jos užtikrina medžiagų apykaitos aktyvumą. Pagal bendrai priimtas taisykles ką tik išpjauta oda turi būti panaudota per 24 h, tačiau priimtinas laikymo laikotarpis gali skirtis, atsižvelgiant į medžiagų apykaitoje dalyvaujančių fermentų sistemą ir laikymo temperatūrą (13). Kai odos preparatai naudojami ne iš karto, turi būti pateikti duomenys, kurie rodytų barjerinės funkcijos išsaugojimą.

##### 1.4.5. Bandomoji medžiaga

Bandomoji medžiaga – objektas, kurio skvarbos charakteristikas reikia tirti. Geriausia būtų naudoti bandomąją medžiagą su žymėtaisiais atomais.

##### 1.4.6. Bandomasis preparatas

Bandomosios medžiagos preparatas (pvz., grynas, skiestas arba bandomąją cheminę medžiagą turintis preparatas, dedamas ant odos) turi atitikti (arba būti tikrovišku pakaitalu) preparatą, su kuriuo gali įvykti žmonių arba kitų galimų tikslinių rūšių sąlytis. Visi nukrypimai nuo tikroviškų preparato naudojimo sąlygų turi būti pagrįsti.

#### 1.4.7. Bandomųjų medžiagų koncentracijos vertės ir preparatai

Paprastai naudojamos kelios bandomosios medžiagos koncentracijos vertės, į kurių diapazoną patenka viršutinės galimo žmonių sąlyčio su medžiaga vertės. Be to, reikėtų numatyti tipinės sudėties preparatų bandymą.

#### 1.4.8. Uždėjimas ant odos

Paprastai ant žmonių odos patenka ribotos cheminių medžiagų dozės. Todėl naudojamas kiekis paprastai turėtų atkartoti galimo žmonių sąlyčio su medžiaga kiekį, dažniausiai 1–5 mg/cm<sup>2</sup> kietosios medžiagos arba mažiau kaip 10 µl/cm<sup>2</sup> skysčio. Kiekį reikia pagrįsti numatomomis naudojimo sąlygomis, bandymo tikslais arba bandomojo preparato fizikinėmis charakteristikomis. Pvz., dedamas ant odos kiekis gali būti neribotas, jei plo- to vienetai tenka dideli kiekiai.

#### 1.4.9. Temperatūra

Temperatūra daro įtaką cheminių medžiagų pasyviajai difuzijai (taigi jų sugerčiai per odą). Difuzijos skyrčiau 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 veikiamą bandomuoju preparatu visą bandymo trukmę arba trumpiau (t. y. kartoti konkretų žmonių sąlyčio su medžiaga būdą). Bandomojo preparato perteklius nuplaunamas atitinkama plovimo priemonė, 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 bandymuose turi būti pasiektas atitinkamas regeneravimo laipsnis (t. y. reikėtų siekti 100 ± 10 % radioaktyvumo vidurkio, o nukrypimai turi būti pagrįsti). Bandomosios medžiagos kiekis rinktuvo skystyje, odos preparate, odos paviršiaus ir aparatūros plovimo skysčiuose turi būti nustatytas, taikant tinkamą metodą.

## 2. DUOMENYS

Turi būti pateikta rinktuvo skysčio analizė, bandomosios cheminės medžiagos pasiskirstymas bandymo sistemoje ir sugerties kaip laiko funkcijos kreivė. Kai oda veikiamą ribota doze, turi būti apskaičiuojamas nuo odos nuplautas kiekis, odoje likęs kiekis (ir skirtingose odos sluoksniuose, jei daroma analizė) ir rinktuvo skystyje esantis kiekis (greitis ir naudotos dozės kiekis arba procentinė dalis). Kartais sugertį per odą galima išreikšti naudojant tik apie rinktuvo skystį gautus duomenis. Tačiau, kai pasibaigus bandymui bandomoji medžiaga lieka odoje, šį kiekį gali tekti įtraukti į suminį sugertos medžiagos kiekį (žr. 3 nuorodos 66 pastraipą). Kai oda veikiamą neribota doze, duomenų gali pakakti skvarbos konstantai (Kp) apskaičiuoti. Esant šioms sąlygoms, absorbuotos medžiagos procentinė dalis nėra svarbi.

### 3. ATASKAITOS PATEIKIMAS

#### 3.1. BANDYMO ATASKAITA

Bandymo ataskaitoje turi būti pateikiami protokole nustatyti reikalavimai, įskaitant naudotos sistemos pagrindimą, ir joje turi būti nurodoma tokia informacija:

Bandomoji medžiaga:

- fizinė būsena, fizinės ir cheminės savybės (bent molekulinė masė ir  $\log P_{ow}$ ), grynumas (radiocheminis grynumas);
- identifikavimo informacija (pvz., siuntos numeris);
- tirpumas rinktuvo skystyje.

Bandomasis preparatas:

- sudėtis ir naudojimo pagrindimas;
- vienalytiškumas.

Bandymo sąlygos:

- odos šaltiniai ir vieta, paruošimo metodas, laikymo prieš bandymą sąlygos, bet koks pradinis apdorojimas (plovimas, apdorojimas antibiotikais ir t. t.), odos vientisumo matavimai, medžiagų apykaitos būsena, naudojimo pagrindimas;
- kameros konstrukcija, rinktuvo skysčio sudėtis, rinktuvo skysčio srautas arba mėginių ėmimo laikas ir procedūros;
- informacija apie bandomojo preparato uždėjimą ir naudotos dozės kiekybinis nustatymas;
- veikimo trukmė;
- išsamė informacija apie bandomojo preparato šalinimą nuo odos, pvz., odos plovimas;
- išsamė odos analizė ir visos taikytos odos dalijimo procedūros siekiant parodyti pasiskirstymą odoje;
- 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.

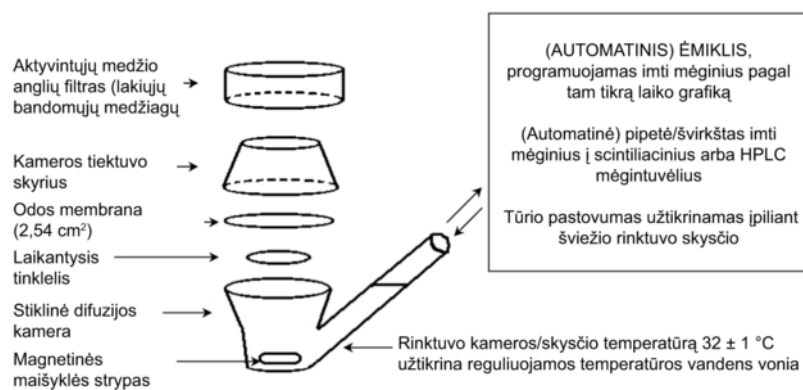


4.

**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.
- 11) Schaefer h and Redelmeier TE. (1996). Skin barrier: principles of percutaneous absorption. Karger, Basel.
- 12) Roberts MS and Walters KA. (1998). Dermal absorption and toxicity assessment. Marcel Dekker, New York.
- 13) Jewell, C, Heylings, JR., Clowes, HM. And Williams, FM. (2000). Percutaneous absorption and metabolism of dinitrochlorobenzene *in vitro*. *Arch Toxicol* 74: p. 356–365.

## 1 paveikslas

Nepratekamojo tipo difuzijos kameros *in vitro* sugerties per odą bandymams atlikti konstrukcijos pavyzdys

**C DALIS. EKOTOKSIŠKUMO NUSTATYMO METODAI**

## TURINYS

C.1.	ŪMUS TOKSIŠKUMAS ŽUVIMS .....	447
C.2.	<i>DAPHNIA</i> SP. ŪMAUS JUDRUMO SLOPINIMO (IMOBILIZAVIMO) BANDYMAS .....	457
C.3.	DUMBLIŲ INHIBAVIMO BANDYMAS .....	465
C.4.	LENGVO BIOLOGINIO SKAIDUMO NUSTATYMAS .....	474
I DALIS.	BENDRIEJI KLAUSIMAI .....	474
II DALIS.	DOC IŠŅYKIMO BANDYMAS (C.4 – A METODAS) .....	481
III DALIS.	MODIFIKUOTAS OECD ATRANKOS BANDYMAS (C.4 – B METODAS) .....	485
IV DALIS.	CO <sub>2</sub> IŠSISKYRIMO BANDYMAS (C.4 – C METODAS) .....	489
V DALIS.	MANOMETRINIS RESPIROMETRINIS BANDYMAS (C.4 – D METODAS) .....	494
VI DALIS.	UŽDAROSIOS KOLBOS BANDYMAS (C.4 – E METODAS) .....	498
VII DALIS.	M.I.T.I. BANDYMAS (C.4 -F METODAS) .....	503
C.5.	SKAIDYMAS. BIOCHEMINIS DEGUONIES SUVARTOJIMAS .....	515
C.6.	SKAIDYMAS. CHEMINIS DEGUONIES SUVARTOJIMAS .....	517
C.7.	SKAIDYMAS. ABIOTINIS SKAIDYMAS. HIDROLIZĖ KAIP pH FUNKCIJA .....	519
C.8.	TOKSIŠKUMAS SLIEKAMS .....	534
C.9.	BIOLOGINIS SKAIDYMAS – ZAHN-WELLENS BANDYMAS .....	539
C.10.	BIOLOGINIS SKAIDYMAS. AKTYVIOJO DUMBLO MODELIAVIMO BANDYMAS .....	546
C.11.	BIOLOGINIS SKAIDYMAS. AKTYVIOJO DUMBLO KVĖPAVIMO INHIBAVIMO BANDYMAS ...	560
C.12.	BIOLOGINIS SKAIDYMAS. MODIFIKUOTAS SCAS BANDYMAS .....	565
C.13.	BIOLOGINIS KONCENTRAVIMAS. DINAMINIS BANDYMAS SU ŽUVIMIS .....	572
C.14.	ŽUVŲ MAILIAUS AUGIMO BANDYMAS .....	591
C.15.	TRUMPALAIKIO TOKSIŠKUMO ŽUVIMS BANDYMAS EMBRIONO IR TRYNIO MAIŠELIO STADIJOSE .....	604
C.16.	NAMINĖS BITĖS. ŪMUS TOKSIŠKUMAS PER VIRŠKINAMĄJĮ TRAKTĄ .....	619
C.17.	NAMINĖS BITĖS. ŪMAUS KONTAKTINIO TOKSIŠKUMO BANDYMAS .....	624
C.18.	ADSORBCIJA/DESORBCIJA TAIKANT STATINĖS PUSIAUSVYROS METODĄ .....	628
C.19.	ADSORBCIJOS KOEFICIENTO (K <sub>oc</sub> ) NUSTATYMAS DIRVOŽEMYJE IR NUOTEKŲ DUMBLE AUKŠTOS SKYRIMO GALIOS SKYSCIŲ CHROMATOGRAFIJA (HPLC) .....	667

---

C.20.	DAPHNIA MAGNA REPRODUKCIJOS BANDYMAS .....	675
C.21.	DIRVOŽEMIO MIKROORGANIZMAI. AZOTO TRANSFORMAVIMO BANDYMAS .....	694
C.22.	DIRVOŽEMIO MIKROORGANIZMAI. ANGLIES TRANSFORMAVIMO BANDYMAS .....	702
C.23.	AEROBINIS IR ANAEROBINIS TRANSFORMAVIMAS DIRVOŽEMYJE .....	710
C.24.	AEROBINIS IR ANAEROBINIS TRANSFORMAVIMAS VANDENS TELKINIŲ DUGNO NUOSĖDŲ SISTEMOSE .....	725

## C.1. ŪMUS TOKSIŠKUMAS ŽUVIMS

## 1. METODAS

## 1.1. ĮVADAS

Šio metodo tikslas – nustatyti medžiagos ūmų mirtiną toksiškumą žuvims gelame vandenyje. Kad būtų galima pasirinkti tinkamiausią bandymo metodą (stacionarų, pusiau stacionarų arba dinaminį), kuriuo visą bandymo laiką būtų užtikrinta pakankamai pastovi bandomosios medžiagos koncentracija, pageidautina turėti kiek galima daugiau informacijos apie medžiagos tirpumą vandenyje, garų slėgį, cheminių patvarumą, disociacijos konstantas ir biologinį skaidumą.

Planuojant bandymą ir aiškinant jo rezultatus, turėtų būti atsižvelgta į papildomą informaciją (pvz., struktūrinė formulė, grynumo laipsnis, reikšmingų priemaišų prigimtis ir procentinis kiekis, priedų buvimas ir jų kiekis, pasiskirstymo koeficientas (n-oktanolis/vanduo)).

## 1.2. APIBRĖŽTYS IR VIENETAI

Ūmus toksiškumas – stebimas neigiamas poveikis, sukeltas organizme per trumpą medžiagos veikimo laiką (paros). Šiame bandyme ūmus toksiškumas išreiškiamas vidutine mirtina koncentracija ( $LC_{50}$ ) – medžiagos koncentracija vandenyje, nuo kurios per nepertraukiamo veikimo laikotarpį, kurį reikia nurodyti, žūsta 50 % bandomosios partijos žuvų.

Kiekviena bandomosios medžiagos koncentracija nurodoma mase tūrio vienetui (mg/l). Ją dar galima išreikšti mase masės vienetui (mg/kg).

## 1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Kaip priemonė parodyti, kad laboratorinėmis bandymo sąlygomis bandomųjų rūšių gyvūnų reakcija labai nepakito, gali būti atliekamas bandymas su etalonine medžiaga.

Šiam bandymui etaloninės medžiagos nėra apibrėžtos.

## 1.4. BANDYMO METODO PRINCIPAS

Galima atlikti ribinį bandymą su 100 mg/l koncentracija, norint įrodyti, kad  $LC_{50}$  yra didesnė nei ši koncentracija.

Žuvis 96 valandas veikiamos bandomąja medžiaga, dedama į vandenį esant tam tikram koncentracijos verčių intervalui. Gaištamumo duomenys užrašomi bent kas 24 valandas, ir, jei įmanoma, per kiekvieną stebėjimo laiko atkarpą apskaičiuojama koncentracija, nuo kurios žūsta 50 % žuvų ( $LC_{50}$ ).

## 1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

Kokybės kriterijai taikomi ir ribinio bandymo metodui, ir viso bandymo metodui.

Gaištamumas kontroliniuose bandymuose bandymo pabaigoje neturi būti didesnis kaip 10 % (arba viena žuvis, jei naudojama mažiau kaip dešimt žuvų).

Ištirpusio deguonies koncentracija visą laiką turi būti didesnė kaip 60 % oro prisotinimo vertės.

Bandomosios medžiagos koncentracija visą bandymo laiką laikoma 80 % pradinės koncentracijos vertės ribose.

Medžiagų, kurios lengvai tirpsta bandomojoje terpėje ir kurių tirpalai patvarūs, t. y. kuriuose ištirpinta medžiaga žymiai negaruoja, nesuyra, nesihidrolizuoja arba neadsorbuojama, pradine koncentracija galima laikyti vardinę medžiagos koncentraciją. Turi būti pateikti įrodymai, kad koncentracijos buvo išlaikytos per visą bandymą ir kad kokybės kriterijai buvo įvykdyti.

Medžiagų, kurios:

- i) mažai tirpsta bandomojoje terpėje arba
- ii) gali sudaryti patvarias emulsijas arba dispersijas; arba
- iii) yra nepatvarios vandeniniuose tirpaluose;

pradine koncentracija laikoma koncentracija, nustatyta tirpale (ar, jei techniškai tai neįmanoma, išmatuota vandens tūryje) bandymo pradžioje. Koncentracija nustatoma po to, kai nusistovi pusiausvyra, tačiau prieš įdedant bandomąsias žuvis.

Visais šiais atvejais siekiant patvirtinti faktines veikimo koncentracijas arba kokybės kriterijų vykdymą, bandymo metu turi būti daromi tolesni matavimai.

pH vertė neturi keistis daugiau kaip 1 pH vienetu.

## 1.6. BANDYMO METODO APRAŠYMAS

Galima naudoti trijų tipų metodiką:

*Bandymas stacionariomis sąlygomis*

Toksiškumo bandymas, kai bandomasis tirpalas neteka. (Tirpalai visą bandymą nekeičiami).

*Bandymas pusiau stacionariomis sąlygomis*

Bandymas, kai bandomasis tirpalas neteka, tačiau per ilgesnį laiko tarpą (pvz., kas 24 valandas) daromas reguliarus dozuojamasis bandomojo tirpalo atnaujinimas.

*Dinaminis bandymas*

Toksiškumo bandymas, kai vanduo bandymo kameroje atnaujinamas visą laiką, bandomąją medžiagą tiekiant su vandeniu, naudojamu bandomajai terpei atnaujinti.

### 1.6.1. Reagentai

#### 1.6.1.1. Bandomųjų medžiagų tirpalai

Pradiniai reikiamos koncentracijos tirpalai ruošiami ištirpinant medžiagą dejonizuotame vandenyje arba vandenyje pagal 1.6.1.2.

Pasirinktos bandymo koncentracijos tirpalai ruošiami skiedžiant pradinį tirpalą. Jei bandomos didelės koncentracijos, medžiaga gali būti tiesiogiai ištirpinta skiedimo vandenyje.

Paprastai medžiagos turi būti bandomos tik iki tirpumo ribos. Norint užtikrinti, kad kai kurios medžiagos (pvz., vandenyje mažai tirpios medžiagos, medžiagos, kurių didelis  $P_{ow}$  arba medžiagos, kurios sudaro patvarią dispersiją, o ne tikrąjį tirpalą vandenyje) pasiektų didžiausią tirpią/pastovią koncentraciją, galima atlikti bandymą naudojant koncentraciją, didesnę už medžiagos tirpumo ribą. Tačiau svarbu, kad tokia koncentracija kitais atžvilgiais nesutrikdytų bandymo sistemos (pvz., vandens paviršiuje nesusidarytų bandomosios medžiagos plėvelė, kuri neleistų į vandenį patekti deguoniui, ir t. t.).

Ruošiant vandenyje mažai tirpių medžiagų pradinius tirpalus arba norint pagerinti šių medžiagų dispergavimą bandomojoje terpėje, kaip pagalbinę priemonę galima naudoti dispergavimą ultragarsu, organinius tirpiklius, emulsiklius arba dispergentus. Kai naudojamos tokios pagalbinės medžiagos, visuose bandomųjų koncentracijų tirpaluose turi būti toks pat pagalbinės medžiagos kiekis, ir papildoma kontrolinė žuvis turi būti veikiamą pagalbinę medžiagą, kurios koncentracija tokia pat, kaip ir bandymų serijoje. Tokių pagalbinių medžiagų koncentracija turi būti kiek įmanoma mažesnė ir jokių būdu neturi būti didesnė kaip 100 mg/l bandomojoje terpėje.

Bandymas turi būti atliekamas nereguliuojant pH vertės. Jei yra įrodymų apie žymų pH vertės kitimą, patartina bandymą kartoti reguliuojant pH vertę, ir bandymo rezultatus pateikti ataskaitoje. Tokiu atveju pradinio tirpalo pH vertė turi būti pakoreguota iki skiedimo vandens pH vertės, jei nėra ypatingos priežasties to nedaryti. Šiam tikslui geriausia naudoti HCl ir NaOH. Šis pH reguliavimas turi būti daromas taip, kad bandomosios medžiagos koncentracija pradiniam tirpale žymiai nepasikeistų. Jei reguliuojant pH įvyksta kokia nors cheminė reakcija arba bandomoji medžiaga fiziškai iškrenta į nuosėdas, tai turi būti nurodyta ataskaitoje.

#### 1.6.1.2. *Laikymo ir skiedimo vanduo*

Galima naudoti geriamąjį vandentiekio vandenį (neužterštą potencialiai kenksmingos koncentracijos chloru, sunkiaisiais metalais arba kitomis medžiagomis), geros kokybės gamtinį vandenį arba atkurtąjį vandenį (žr. 1 priedėlį). Geriausiai tinka vanduo, kurio bendrasis kietumas yra nuo 10 iki 250 mg/litre (skaičiuojant CaCO<sub>3</sub>) ir kurio pH yra nuo 6,0 iki 8,5.

#### 1.6.2. **Aparatūra**

Visa aparatūra turi būti pagaminta iš chemiškai inertiškų medžiagų:

- automatinė skiedimo sistema (dinaminiam bandymui),
- deguonies matuoklis,
- įranga vandens kietumui nustatyti,
- atitinkama termostataavimo aparatūra,
- pH-metras.

#### 1.6.3. **Bandomosios žuvis**

Žuvis turi būti sveikos ir neturėti jokių matomų nenormalumo požymių.

Žuvų rūšį reikia rinktis remiantis praktiniais kriterijais, pvz., galimybe žuvis gauti ištisis metus ir priežiūros paprastumas, patogumas bandyti, santykinis jautrumas cheminėms medžiagoms bei kitais reikšmingais ekonominiais, biologiniais arba ekologiniais faktoriais. Be to, renkantis žuvų rūšis, reikia atkreipti dėmesį į gautų duomenų palyginamumo poreikį ir esamą tarptautinį derinimą (1 nuoroda).

Žuvų, kurias rekomenduojama naudoti šiame bandyme, sąrašas pateiktas 2 priedėlyje; tinkamiausios rūšys yra zebrynė danija ir vaivorykštinis upėtakis.

#### 1.6.3.1. *Laikymas*

Pageidautina, kad bandomosios žuvis būtų iš vienos partijos ir panašaus ilgio bei amžiaus. Žuvis turi būti laikomos bent 12 parų tokiomis sąlygomis:

*įkrova:*

atitinkanti sistemą (su recirkuliacija arba su pratekėjimu) ir žuvų rūšį,

*vanduo:*

žr. 1.6.1.2,

*šviesa:*

kasdienis apšvietimas nuo 12 iki 16 valandų,

*ištirpusio deguonies koncentracija:*

bent 80 % oro prisotinimo vertės,

*maitinimas:*

tris kartus per savaitę arba kas dieną, nutraukiant maitinimą prieš 24 valandas iki bandymo pradžios.

#### 1.6.3.2. *Gaištamumas*

Po 48 valandų prisitaikymo laikotarpio užrašomi gaištamumo duomenys ir taikomi tokie kriterijai:

— populiacijos gaištamumas per septynias paras didesnis kaip 10 %:

visa partija atmetama,

— populiacijos gaištamumas 5–10 %:

laikoma dar septynias paras.

Jei gaištamumas nedidėja, partija priimama, priešingu atveju turi būti atmesta,

— populiacijos gaištamumas mažesnis kaip 5 %:

partija priimama.

#### 1.6.4. **Adaptavimas**

Prieš naudojant visos žuvys bent septynias paras turi būti laikomos vandenyje, kurio kokybė ir temperatūra atitinka bandymo sąlygas.

#### 1.6.5. **Bandymo procedūra**

Norint gauti informacijos apie koncentraciją, kurias reikia naudoti pagrindiniame bandyme intervalą, prieš galutinį bandymą gali būti atliekamas intervalo nustatymo bandymas.

Atliekamas vienas kontrolinis bandymas be bandomosios medžiagos ir, jei tinka, bandymų serija papildoma dar vienu kontroliniu bandymu, kuriame naudojama pagalbinė medžiaga.

Pagal tai, kokios yra bandomosios medžiagos fizikinės ir cheminės savybės, turi būti pasirinktas bandymas stacionariomis, pusiau stacionariomis sąlygomis arba dinaminis bandymas, kad būtų tenkinami kokybės kriterijai.

Žuvys veikiamos medžiaga, kaip aprašyta toliau:

— trukmė – 96 valandos,

— gyvūnų skaičius – bent 7 vienai koncentracijai,

— rezervuarai – tinkamo tūrio, atsižvelgiant į rekomenduojamą įkrovą,

— įkrova – didžiausia rekomenduojama bandymo stacionariomis ir pusiau stacionariomis sąlygomis įkrova – 1 g/l; sistemoms su pratekėjimu galima naudoti didesnę įkrovą,

— bandomoji koncentracija – bent penkios koncentracijos, kurios skiriasi pastoviu faktoriumi, ne didesniu kaip 2,2, bei kiek įmanoma apima gaištamumo intervalą nuo 0 iki 100 %,

— vanduo – žr. 1.6.1.2,



- šviesa – kasdienis apšvietimas, kurio trukmė nuo 12 iki 16 valandų,
- temperatūra – tinkama rūšiai (2 priedėlis), tačiau konkrečiame bandyme palaikoma  $\pm 1$  °C tikslumu,
- ištirpusio deguonies koncentracija – ne mažesnė kaip 60 % oro prisotinimo vertės, pasirinktos temperatūros sąlygomis,
- maitinimas – jokie.

Žuvis tikrinamos po pirmųjų 2–4 valandų ir bent kas 24 valandas. Žuvis laikoma nugaišusia, jei liečiant uodegos stiebelį (*caudal peduncle*) nėra jokios reakcijos ir jei nesimato jokių kvėpavimo judesių. Po apžiūros nugaišusios žuvis pašalinamos ir užrašomas nugaišusių žuvų skaičius. Užrašomi pastebimi nenormalumai (pvz., pusiausvyros netekimas, plaukimo manieras, kvėpavimo funkcijos, pigmentacijos pokyčiai ir t. t.).

pH, ištirpęs deguonis ir temperatūra turi būti matuojami kas dieną.

#### *Ribinis bandymas*

Taikant šiame bandymo metode aprašytas metodikas, galima atlikti ribinį bandymą su koncentracija 100 mg/litre, kai norima įrodyti, kad LC<sub>50</sub> yra didesnė nei ši koncentracija.

Jei medžiagos prigimtis yra tokia, kad 100 mg/litre koncentracijos bandymo vandenyje pasiekti negalima, ribinis bandymas turi būti atliekamas su koncentracija, lygia medžiagos tirpumui (arba su didžiausia koncentracija, kurioje susidaro patvari dispersija) naudojamoje terpėje (dar žr. 1.6.1.1 punktą).

Ribinis bandymas turi būti atliekamas su 7–10 žuvų, toks pat žuvų skaičius turi būti naudojamas kontroliniame (-iuose) bandyme (-uose). (Pagal binominio skirstinio teoriją, jei bandyme su 10 žuvų gaištamumas yra nulinis, pasiklovimo tikimybė, kad LC<sub>50</sub> yra didesnė nei ribiniame bandyme naudota koncentracija, yra 99,9 %. Gaištamumo nebuvimas naudojant 7, 8 arba 9 žuvis rodo bent 99 % pasiklovimo tikimybę, kad LC<sub>50</sub> yra didesnė nei naudota koncentracija).

Jei gaištamumo atvejų pasitaiko, turi būti atliekamas visas tyrimas. Jei stebimi subletalūs padariniai, tai turi būti užrašyta ataskaitoje.

## 2. DUOMENYS IR VERTINIMAS

Kiekvienam laikotarpiui, kurio rezultatai buvo užrašyti (24, 48, 72 ir 96 valandos), logaritminiame tikimybinia-me popieriuje braižykite gaištamumo, nustatyto kiekvienu rekomenduojamu veikimo laikotarpiu, procentinės vertės priklausomybės nuo koncentracijos kreivę.

Kai įmanoma, kiekvienu matavimo laikotarpiu reikia įvertinti LC<sub>50</sub> ir pasiklovimo ribas ( $p = 0,05$ ), tam taikant standartines metodikas; šios vertės turi būti apvalinamos iki vieno ar, daugiausia, iki dviejų reikšminių skaitmenų (apvalinimo iki dviejų skaitmenų pavyzdys: 170 vietoj 173,5; 0,13 vietoj 0,127; 1,2 vietoj 1,21).

Tais atvejais, kai atsako procentinės vertės ir koncentracijos priklausomybės kreivės polinkis yra per status, kad būtų galima skaičiuoti LC<sub>50</sub>, pakanka grafinio šios vertės įverčio.

Kai dviem gretimoms koncentracijoms, kurių santykis 2,2, gaunamos 0 ir 100 % gaištamumo vertės, šių dviejų verčių pakanka pažymėti intervalui, į kurį patenka LC<sub>50</sub>.

Jei pastebima, kad bandomosios medžiagos patvarumo arba homogeniškumo užtikrinti neįmanoma, tai turi būti nurodyta ataskaitoje, o aiškinti rezultatus reikia atsargiai.

## 3. ATASKAITA

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

- informacija apie bandomąsias žuvis (mokslinis pavadinimas, veislė, tiekėjas, bet koks išankstinis apdorojimas, dydis ir kiekvienai bandomajai koncentracijai naudotų žuvų skaičius),
- skiedimo vandens šaltinis ir pagrindinės cheminės savybės (pH, kietumas, temperatūra),

- mažai vandenyje tirpios medžiagos atveju, pradinio tirpalo ir bandomųjų tirpalų ruošimo metodas;
- kiekvienos pagalbinės medžiagos koncentracija,
- naudotų koncentracijų sąrašas ir visa turima informacija apie bandomosios medžiagos patvarumą naudotos koncentracijos bandomajame tirpale,
- jei atliekama cheminė analizė, taikyti metodai ir gauti rezultatai,
- ribinio bandymo, jei jis buvo atliekamas, rezultatai,
- taikytos bandymo metodikos pasirinkimo priežastys ir detalės (pvz., stacionariomis sąlygomis, pusiau stacionariomis sąlygomis, dozavimo srautas, pratekėjimo srautas, ar buvo naudojamas aeravimas, žuvų įkrovą ir t. t.),
- bandymo įrangos aprašymas,
- apšvietimo režimas,
- ištirpusio deguonies koncentracija bandomuosiuose tirpaluose, jų pH vertė ir temperatūra kas 24 valandas,
- įrodymas, kad kokybės kriterijai įvykdyti,
- lentelė, kurioje pateiktas kiekvieno rekomenduojamo matavimo laikotarpio bendras gaištamumas kiekvienos koncentracijos atveju ir kontroliniame bandyme (ir kontroliniame bandyme su pagalbine medžiaga, jei reikia),
- atsako procentinės vertės priklausomybės nuo koncentracijos kreivės grafikas bandymo pabaigoje,
- jei įmanoma, kiekvieno rekomenduojamo matavimo laikotarpio LC<sub>50</sub> vertės (su 95 % pasikliovimo ribomis),
- statistinės metodikos, taikytos LC<sub>50</sub> vertėms nustatyti,
- jei naudota etaloningė medžiaga, gauti rezultatai,
- didžiausia bandomoji koncentracija, kurią naudojant gaištamumas bandymo laikotarpiu yra nulinis,
- mažiausia bandomoji koncentracija, bandymo laikotarpiu sukianti 100 % gaištamumą.

#### 4. NUORODOS

- 1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 203, Decision of the Council C(81) 30 final and updates.
- 2) AFNOR-Determination of the acute toxicity of a substance to *Brachydanio rerio* – Static and Flow Through methods – NFT 90–303 June 1985.
- 3) AFNOR- Determination of the acute toxicity of a substance to *Salmo gairdneri* – Static and Flow – Through methods – NFT 90–305 June 1985.
- 4) ISO 7346/1, /2 and/3 – Water Quality – Determination of the acute lethal toxicity of substances to a fresh water fish (*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan – Teleostei, Cyprinidae). Part 1: Static method. Part 2: Semi-static method. Part 3: Flow-through method.
- 5) Eidgenossisches Department des Innern, Schweiz: Richtlinien 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.
- 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<sub>50</sub>. 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<sub>50</sub>. US EPA.

## 1 priedėlis

**Atkurtasis vanduo***Skiedimui tinkamo vandens pavyzdys*

Visos cheminės medžiagos turi būti analiziškai grynos.

Vanduo turi būti geros kokybės distiliuotas vanduo arba dejonizuotas vanduo, kurio savitasis laidumas būtų mažesnis kaip  $5\mu\text{Scm}^{-1}$ .

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.

$\text{NaHCO}_3$  (natrio hidrokarbonatas): 2,59 g

Ištirpinkite vandenyje ir praskieskite iki 1 litro.

KCl (kalio chloridas): 0,23 g

Ištirpinkite vandenyje ir praskieskite iki 1 litro.

*Atkurtasis skiedimo vanduo*

Sumaišykite 25 ml kiekvieno iš šių keturių tirpalų ir praskieskite vandeniu iki 1 litro.

Aeruokite tol, kol ištirpusio deguonies koncentracija pasiekia oro prisotinimo vertę.

pH turi būti  $7,8 \pm 0,2$ .

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, rekomenduojamos naudoti bandymuose

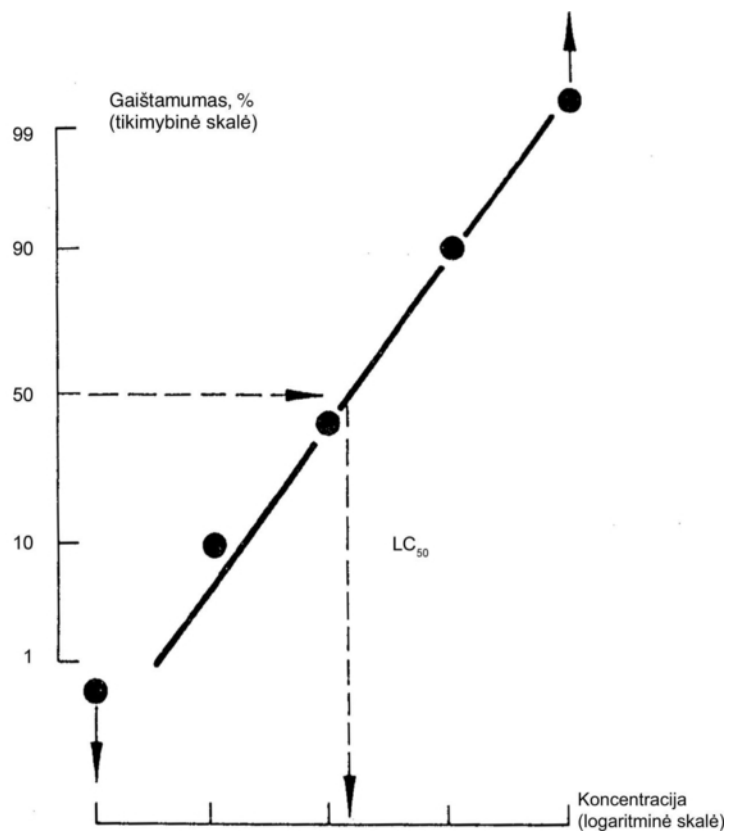
Rekomenduojamos rūšys	Rekomenduojamas bandymo temperatūros intervalas (°C)	Rekomenduojamas bandomojo gyvūno bendras ilgis (cm)
<i>Brachydanio rerio</i> ( <i>Teleostei, Cyprinidae</i> ) Hamilton-Buchanan) Zebrinė danija	nuo 20 iki 24	3,0 ± 0,5
<i>Pimephalespromelas</i> ( <i>Teleostei, Cyprinidae</i> ) (Rafinesque) Juodoji drūtgalvė rainė	nuo 20 iki 24	5,0 ± 2,5
<i>Cyprinus carpio</i> ( <i>Teleostei, Cyprinidae</i> ) (Linneaus 1758) Paprastasis karpis	nuo 20 iki 24	6,0 ± 2,0
<i>Oryzias latipes</i> ( <i>Teleostei, Poeciliidae</i> ) <i>Cyprinodontidae</i> (Tomminck and Schlege 1850) Japoninė medaka	nuo 20 iki 24	3,0 ± 1,0
<i>Poecilia reticulata</i> ( <i>Teleostei, Poeciliidae</i> ) (Peters 1859) Paprastasis gupis	nuo 20 iki 24	3,0 ± 1,0
<i>Lepomis macrochirus</i> ( <i>Teleostei, Centrarchidae</i> ) (Rafinesque Linneaus 1758) Melsvažiaunius saulešeris	nuo 20 iki 24	5,0 ± 2,0
<i>Onchorhynchus mykiss</i> ( <i>Teleostei, Salmonidae</i> ) (Walbaum 1988) Vaivorykštinis upėtakis	nuo 12 iki 17	6,0 ± 2,0
<i>Leuciscus idus</i> ( <i>Teleostei, Cyprinidae</i> ) (Linneaus 1758) Paprastoji meknė	nuo 20 iki 24	6,0 ± 2,0

**Rinkimas**

Lentelėje nurodytas žuvis lengva auginti ir (arba) jų galima gauti ištiesus metus. Žuvis galima auginti ir veisti žuvų fermose arba laboratorijoje, ligų ir parazitų kontrolės sąlygomis, kad bandomieji gyvūnai būtų sveiki ir būtų žinoma jų kilmė. Šių žuvų yra daugelyje pasaulio kraštų.

## 3 priedėlis

## Koncentracijos pavyzdys. Gaištamumo dalis procentais

LC<sub>50</sub> nustatymo naudojant logaritminį tikimybinį popierių pavyzdys

**C.2. DAPHNIA SP. ŪMAUS JUDRUMO SLOPINIMO (IMOBILIZAVIMO) BANDYMAS****1. METODAS**

Šis ūmaus judrumo slopinimo bandymas atitinka OECD TG 202 (2004).

**1.1. ĮVADAS**

Šiame bandymo metode aprašomas ūmaus toksiškumo bandymas, skirtas įvertinti cheminių medžiagų poveikį dafnijoms. Kiek įmanoma buvo naudojami esami bandymo metodai (1)(2)(3).

**1.2. SĄVOKOS**

Šiame bandymo metode taikomos šios sąvokos:

**EC<sub>50</sub>** – apskaičiuotoji koncentracija, kuriai esant 50 % dafnijų nustoja judėti per nustatytą veikimo laikotarpį. Jei vartojama kita apibrėžtis, ji ir jos nuoroda turi būti pateiktos ataskaitoje.

**Judrumo slopinimas (imobilizavimas)** – imobilizuotais laikomi tie gyvūnai, kurie negali plaukti praėjus 15 s nuo švelnaus bandymo indo purtymo (net jei jie vis dar gali judinti čiulptukus).

**1.3. BANDYMO METODO PRINCIPAS**

Jaunos dafnijos, kurių amžius bandymo pradžioje mažesnis kaip 24 h, 48 h veikiamos įvairios koncentracijos bandomąja medžiaga. Judrumo slopinimo duomenys užrašomi po 24 h bei 48 h ir lyginami su kontrolinėmis vertėmis. Rezultatai analizuojami po 48 h siekiant apskaičiuoti EC<sub>50</sub> (apibrėžtys pateiktos 1.2 skirsnyje). Papildomai galima nustatyti EC<sub>50</sub> po 24 h.

**1.4. INFORMACIJA APIE BANDOMĄJĄ MEDŽIAGĄ**

Turėtų būti žinomas bandomosios medžiagos tirpumas vandenyje ir garų slėgis, be to, reikėtų turėti patikimą analizės metodą medžiagos kiekiui bandomuosiuose tirpaluose nustatyti, kurio regeneravimo laipsnis ir ribinė nustatymo vertė būtų žinomi. Naudinga žinoti medžiagos struktūrinę formulę, grynumą, patvarumą vandenyje arba veikiant šviesai, P<sub>ow</sub> ir lengvo biologinio skaidumo bandymo rezultatus (žr. C.4 metodą).

Pastaba. Nurodymai, kaip bandyti medžiagas, kurių fizikinės ir cheminės savybės apsunkina jų bandymą, pateikti (4).

**1.5. ETALONINĖS MEDŽIAGOS**

Siekiant įsitikinti, kad bandymo sąlygos yra patikimos, galima atlikti bandymus etaloninės medžiagos EC<sub>50</sub> nustatyti. Šiam tikslui rekomenduojama naudoti tarplaboratoriniuose bandymuose naudotas toksines medžiagas (1)(5) (1). Bandymą (-us) su etalonine medžiaga būtų gerai kartoti kas mėnesį, bet ne rečiau kaip du kartus per metus.

**1.6. 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  $\geq 3$  mg/l.

(1) Pagal šiuos tarplaboratorinių bandymų rezultatus ir ISO 6341 techninę pataisą kalio dichromato (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) EC<sub>50</sub> vertė po 24 h yra nuo 0,6 mg/l iki 1,7 mg/l.

Pastaba. Kalbant apie pirmą kriterijų, judrumo slopinimas arba kiti ligos arba įtampos požymiai, pvz., spalvos kitimas, neįprastas elgesys, pvz., iškilimas į vandens paviršių, turėtų pasireikšti ne daugiau kaip 10 % kontrolinių dafnijų.

## 1.7. BANDYMO METODO APRAŠYMAS

### 1.7.1. Aparatūra

Bandymo indai ir kiti prietaisai, kurie liečiasi su bandomaisiais tirpalais, turi būti pagaminti vien tik iš stiklo arba kitos chemiškai inertiškos medžiagos. Bandymui paprastai naudojami stikliniai mėgintuvėliai arba cheminės stiklinės; prieš kiekvieną naudojimą jos turėtų būti plaunamos taikant įprastas laboratorijos procedūras. Bandymo indai nesandariai uždaromi, kad būtų sumažinti vandens nuostoliai dėl garavimo ir dulks nepatektų į tirpalus. Lakiosios medžiagos turėtų būti bandomos visiškai užpildytuose uždarytuose induose, kurie būtų pakankamai dideli, kad deguonies koncentracija nepasiektų ribinių arba per mažų verčių (žr. 1.6 skirsnį ir 1.8.3 skirsnio pirmą pastraipą).

Be to, naudojama kai kuri arba visa toliau išvardyta įranga: deguonies matuoklis (su mikroelektrodu arba kitokiu įtaisu, tinkamu ištirpusiam deguoniui mažo tūrio ėminiuose matuoti); pH-metras; tinkamas įtaisas temperatūrai reguliuoti; įranga bendrajai organinei angliai (TOC) nustatyti; įranga cheminiam deguonies suvartojimui (COD) nustatyti; įranga vandens kietumui nustatyti ir t. t.

### 1.7.2. Bandomasis organizmas

*Daphnia magna* Straus yra labiausiai bandymui tinkama rūšis, nors leidžiama naudoti ir kitas tinkamas *Daphnia* rūšis (pvz., *Daphnia pulex*). Pradedant bandymą, gyvūnai turi būti jaunesni kaip 24 h amžiaus ir, siekiant sumažinti kintamumą, labai rekomenduojama nenaudoti pirmosios dafnijų palikuonių vados. Jos turėtų būti gautos iš sveikos pradinės kultūros (t. y. nerodančios įtampos požymių, pvz., didelio gaištamumo, vyriškos lyties atstovų ir kiaušinėlių (*ephippia*) buvimo, pirmosios vados vėlavimo, gyvūnų spalvos pasikeitimo ir t. t.). Visų konkrečiam bandymui naudojamų organizmų kultūra turėtų būti gauta iš tos pačios pradinės dafnijų kultūros. Pradinės kultūros gyvūnus reikėtų laikyti tokiais sąlygomis (šviesa, temperatūra, terpė), kurios būtų panašios į bandymo sąlygas. Jei bandymui reikalinga terpė skiriasi nuo įprastos dafnijų kultūros terpės, būtų gerai numatyti dafnijų aklimatizavimo laikotarpį. Todėl veislei naudojamoms dafnijoms bent 48 h iki bandymo pradžios laikomos skiedimo vandenyje esant bandymo temperatūrai.

### 1.7.3. Laikymo ir skiedimo vanduo

Laikymo ir skiedimo vanduo gali būti gamtinis vanduo (paviršinis arba gruntinis vanduo), atkurtasis arba vandentiekio vanduo, iš kurio pašalinamas chloras, jei dafnijos jame išgyvena kultūros veisimo, aklimatizavimo ir bandymo laikotarpiu, nerodydamos įtampos požymių. Bet koks vanduo, kuris atitinka 1 priedėlyje išvardytas priimtino skiedimo vandens chemines charakteristikas, tinka bandymui. Jo kokybė turėtų būti stabili visą bandymo laiką. Atkurtasis vanduo gali būti gaminamas į dejonizuotą arba distiliuotą vandenį dedant tam tikrus pripažinto analizinio grynumo reagentų kiekius. Atkurtojo vandens pavyzdžiai pateikti (1) (6) ir 2 priedėlyje. Būtina atkreipti dėmesį, kad tiriant metalų turinčias medžiagas, reikia vengti naudoti terpes, turinčias žinomas chelantus, tokias kaip 2 priedėlyje nurodytas M4 ir M7 terpes. pH vertė turi būti nuo 6 iki 9. *Daphnia magna* rekomenduojamas vandens kietumas – nuo 140 iki 250 mg/l (skaičiuojant CaCO<sub>3</sub>), o kitoms *Daphnia* rūšims gali tikti mažesnis kietumas. Prieš naudojant bandymui, skiedimo vandenį galima aeruoti, kad ištirpusio deguonies koncentracija pasiektų sotį.

Jei naudojamas gamtinis vanduo, kokybės parametrus reikėtų matuoti bent du kartus per metus arba kilus įtarimui, kad šios charakteristikos galėjo labai pasikeisti (žr. pirmesnę pastraipą ir 1 priedėlį). Be to, reikėtų nustatyti sunkiųjų metalų (pvz., Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni) kiekį. Jei naudojamas vandentiekio vanduo, iš kurio pašalintas chloras, pageidautina kasdien atlikti chloro analizę. Jei skiedimo vandens šaltinis yra paviršinis arba gruntinis vanduo, reikėtų matuoti savitąjį laidį ir bendrąją organinę anglį (TOC) arba cheminį deguonies suvartojimą (COD).

### 1.7.4. Bandomieji tirpalai

Pasirinktos koncentracijos bandomieji tirpalai paprastai ruošiami skiedžiant pradinį tirpalą. Pradinius tirpalus geriau ruošti tirpinant bandomąją medžiagą skiedimo vandenyje. Kiek įmanoma reikia vengti naudoti tirpiklius, emulsiklius arba dispergentus. Tačiau kartais tokių junginių gali prireikti tinkamos koncentracijos pradiniam tirpalui ruošti. Nurodymai dėl tinkamų tirpiklių, emulsiklių ir dispergentų pateikti (4). Bet kuriuo atveju bandomosios medžiagos koncentracija bandomuosiuose tirpaluose neturi būti didesnė kaip tirpumo skiedimo vandenyje ribinė vertė.



Bandymas turėtų būti atliekamas nereguliuojant pH. Jei pH vertė yra ne 6–9 intervale, gali būti atliekamas antras bandymas, pradinio tirpalo pH nustatant pagal skiedimo vandens pH vertę, buvusią iki bandomosios medžiagos pridėjimo. pH reguliuojamas taip, kad pradinio tirpalo koncentracija labai nesikeistų ir nepradėtų vykti kokia nors cheminė reakcija arba nesusidarytų bandomosios medžiagos nuosėdos. Labiausiai tinka HCl ir NaOH.

## 1.8. PROCEDŪRA

### 1.8.1. Veikimo sąlygos

#### 1.8.1.1. Bandomosios ir kontrolinės grupės

Į bandymo indus įpilami reikalingi skiedimo vandens ir bandomosios medžiagos tūriai. Oro/vandens tūrio santykis inde turi būti vienodas bandomosios ir kontrolinėms grupėms. Tuomet į bandymo indus dedamos dafnijos. Kiekvienai bandomajai koncentracijai ir kiekvienam kontroliniam ėminiui reikia naudoti bent 20 gyvūnų, kuriuos geriau būtų padalyti į keturias grupes po penkis gyvūnus. Kiekvienam gyvūnui turėtų tekti bent 2 ml bandomojo tirpalo (t. y. 10 ml tūris penkioms dafnijoms bandymo inde). Bandymą galima atlikti taikant pusiau statinį atnaujinimą arba pratekėjimo sistemą, kai bandomosios medžiagos koncentracija nėra pastovi.

Be tirpalų grupės su bandomąja medžiaga bandymų turi būti atliekamas vienos kontrolinės skiedimo vandens ėminių grupės bandymas ir prireikus vienos kontrolinės ėminių grupės su tirpinimo medžiaga bandymas.

#### 1.8.1.2. Bandomosios koncentracijos vertės

Jei nėra informacijos apie bandomosios medžiagos toksiškumą, galima atlikti intervalo nustatymo bandymą galutinio bandomosios koncentracijos intervalo vertėms nustatyti. Šiuo tikslu dafnijos veikiamos bandomosios medžiagos tirpalais, kurių koncentracijos vertės labai skiriasi. Penkios dafnijos veikiamos kiekvienos koncentracijos tirpalu 48 h arba mažiau, kartotiniai ėminiai nebūtini. Veikimo laikotarpį galima sutrumpinti (pvz., 24 h arba mažiau), jei intervalo nustatymo bandymui tinkamus duomenis galima gauti per trumpesnę laiką.

Turėtų būti naudojamos bent penkios koncentracijos vertės. Jos turi sudaryti geometrinę progresiją, kurios vardiklis geriausiai atveju neturėtų būti didesnis kaip 2,2. Jei naudojama mažiau koncentracijos verčių, tai būtina pagrįsti. Pageidautina, kad didžiausia bandomoji koncentracija slopintų judrumą 100 %, o mažiausia bandomoji koncentracija nedarytų pastebimo poveikio.

#### 1.8.1.3. Inkubavimo sąlygos

Temperatūra turi būti 18 °C–22 °C ir atliekant kiekvieną atskirą bandymą ji neturi nukrypti daugiau kaip  $\pm 1$  °C. Rekomenduojamas 16 h šviesos ir 8 h tamsos ciklas. Be to, priimtina visiška tamsa, ypač jei bandomosios medžiagos yra nestabilios veikiant šviesai.

Atliekant bandymą indų turinys neaeruojamas. pH vertė nereguliuojama visą bandymą. Atliekant bandymą dafnijos pašaro negauna.

#### 1.8.1.4. Trukmė

Bandymo trukmė 48 h.

### 1.8.2. Stebėjimai

Kiekvienas bandymo indas turi būti tikrinamas po 24 h ir 48 h nuo bandymo pradžios, siekiant nustatyti, ar yra nejudančių dafnijų (apibrėžtys pateiktos 1.2 skirsnyje). Be judrumo slopinimo duomenų ataskaitoje turi būti pateikti duomenys apie bet kokią neįprastą elgesį arba išvaizdą.

### 1.8.3. Analiziniai matavimai

Bandymo pradžioje ir pabaigoje matuojama ištirpusio deguonies koncentracija ir pH vertė kontrolinio (-ių) ėminio (-ių) ir didžiausios bandomosios medžiagos koncentracijos induose. Kontrolinių ėminių ištirpusio deguonies koncentracija turi atitikti bandymo tinkamumo kriterijų (žr. 1.6 skirsnį). pH vertė bet kuriame iš bandymo indų paprastai neturėtų keistis daugiau kaip 1,5 vieneto. Paprastai temperatūra matuojama kontrolinių ėminių induose arba aplinkos oro temperatūra ir būtų gerai, jei ji būtų užrašoma nepertraukiamai visą bandymą arba bent bandymo pradžioje ir pabaigoje.

Bandomosios medžiagos koncentracija turėtų būti matuojama bandymo pradžioje ir pabaigoje bent tuose induose, kuriuose bandomoji koncentracija yra mažiausia ir didžiausia (4). Rekomenduojama rezultatus pagrįsti matuojamomis koncentracijos vertėmis. Tačiau jei yra duomenų, kurie leistų įrodyti, kad visą bandymą bandomosios medžiagos koncentracija nenukrypo daugiau kaip  $\pm 20\%$  nuo vardinės arba išmatuotos pradinės koncentracijos vertės, rezultatai gali būti grindžiami vardinėmis arba išmatuotomis pradinėmis vertėmis.

#### 1.9. RIBINIS BANDYMAS

Taikant šiame bandymo metode aprašytas procedūras, galima atlikti ribinį bandymą su bandomosios medžiagos koncentracija 100 mg/l arba koncentracija iki ribinio tirpumo vertės (iš šių dviejų pasirenkant mažesnę), jei norima įrodyti, kad  $EC_{50}$  yra didesnė už šią koncentraciją. Ribinis bandymas turi būti atliekamas su 20 dafnijų (geriausia, kad jos būtų suskirstytos į keturias grupes po penkias dafnijas), tas pats dafnijų skaičius turi būti naudojamas kontroliniam (-iams) bandymui (-ams). Jei vyksta koks nors judrumo slopinimas, turi būti atliekamas visas tyrimas. Turi būti užrašytas kiekvienas neįprasto elgesio atvejis.

#### 2. DUOMENYS

Duomenys turi būti apibendrinti lentelėse, nurodant kiekvienai apdorotai ir kontrolinei grupei naudotų dafnijų skaičių, judrumo slopinimą kiekvieno stebėjimo metu. Braižomas po 24 h ir 48 h nejudančių dafnijų procentinės dalies kaip bandomosios koncentracijos funkcijos grafikas. Duomenys analizuojami taikant atitinkamus statistinius metodus (pvz., probitų analizę ir t. t.) kreivių krypties koeficientams ir  $EC_{50}$  vertėms apskaičiuoti, esant 95 % pasiklovimo riboms ( $p = 0,05$ ) (7) (8).

Jei gautiems duomenims standartiniai  $EC_{50}$  apskaičiavimo metodai netinka, turi būti naudojama didžiausia koncentracija, kuri dar nesukelia judrumo slopinimo, ir mažiausia koncentracija, sukianti 100 % judrumo slopinimą, apytikrei  $EC_{50}$  vertei gauti (ja laikomas šių dviejų koncentracijos verčių geometrinis vidurkis).

#### 3. ATASKAITOS PATEIKIMAS

##### 3.1. BANDYMO ATASKAITA

Bandymo ataskaitoje turi būti ši informacija:

Bandomoji medžiaga:

- fizikinė būsena ir atitinkamos fizikinės ir cheminės savybės,
- cheminės medžiagos identifikavimo duomenys, įskaitant grynumą.

Bandomieji gyvūnai:

- *Daphnia* šaltinis ir rūšis, tiekėjas (jei žinomas) ir naudotos kultūros auginimo sąlygos (įskaitant pašaro šaltinį, rūšį ir kiekį, šėrimo dažnumą).

Bandymo sąlygos:

- bandymo indų aprašymas: indų tipas, tirpalo tūris, dafnijų skaičius viename bandymo inde, bandymo indų (kartotinių) skaičius vienai koncentracijai,
- pradinio ir bandomojo tirpalų ruošimo metodai, įskaitant kokio nors tirpiklio arba dispergento naudojimą, naudotos koncentracijos vertės,
- duomenys apie skiedimo vandenį: šaltinis ir vandens kokybės charakteristikos (pH, kietumas, Ca/Mg santykis, Na/K santykis, šarmingumas, savitasis laidis ir t. t.); atkurtojo vandens sudėtis, jei naudojamas,
- inkubavimo sąlygos: temperatūra, šviesos intensyvumas ir periodiškumas, ištirpusio deguonies kiekis, pH ir t. t.

## Rezultatai:

- kiekvieno stebėjimo metu imobilizuotų dafnijų arba dafnijų, kurioms pasireiškė kitoks neigiamas poveikis (įskaitant neįprastą elgesį), skaičius ir procentinė dalis kontroliniuose ėminiuose ir kiekvienoje apdorotoje grupėje, taip pat stebimo poveikio tipo aprašymas,
- bandymo su etalonine medžiaga rezultatai ir data, jei yra,
- vardinės bandomosios koncentracijos vertės ir visų analizių bandomosios medžiagos koncentracijai bandymo induose nustatyti rezultatai; be to, ataskaitoje turi būti pateiktas metodo regeneravimo laipsnis ir ribinė nustatymo vertė,
- visi bandymo metu atlikti fizikiniai ir cheminiai temperatūros, pH ir ištirpusio deguonies matavimai,
- judrumo slopinimo  $EC_{50}$  po 48 h, nurodant pasiklivimo intervalus ir jiems apskaičiuoti naudotus regresijos modelių grafikus, dozės ir atsako kreivių krypties koeficientai ir jų standartinis nuokrypis; statistinės procedūros, taikytos  $EC_{50}$  nustatyti; (be to, ataskaitoje turi būti nurodyti judrumo slopinimo duomenys, gauti po 24 h, jei jie buvo matuojami),
- visų nukrypimų nuo bandymo metodo paaiškinimas ir nurodymas, ar nukrypimas turėjo įtakos bandymo rezultatams.

## 4. NUORODOS

- 1) ISO 6341. (1996). Water quality – Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) – Acute toxicity test. Third edition,
- 2) EPA OPPTS 850.1010. (1996). Ecological Effects Test Guidelines – Aquatic Invertebrate Acute Toxicity Test, Freshwater Daphnids.
- 3) Environment Canada. (1996) Biological test method. Acute Lethality Test Using *Daphnia* spp. EPS 1/RM/11. Environment Canada, Ottawa, Ontario, Canada.
- 4) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environmental Health and SAFETY Publication. Series on Testing and Assessment. No. 23. Paris 2000.
- 5) Commission of the European Communities. Study D8369. (1979). Inter-laboratory Test Programme concerning the study of the ecotoxicity of a chemical substance with respect to *Daphnia*.
- 6) OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Guideline 211: *Daphnia magna* Reproduction Test, adopted September 1998.
- 7) Stephan C.E. (1977). Methods for calculating an  $LC_{50}$ . In Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (edited by F.I. Mayer and J.L. Hamelink). ASTM STP 634 – American Society for Testing and Materials. p. 65–84
- 8) Finney D.J. (1978). Statistical Methods in Biological Assay. 3<sup>rd</sup> ed. London. Griffin, Weycombe, UK.

## 1 priedėlis

**KAI KURIOS TINKAMO SKIEDIMO VANDENS CHEMINĖS CHARAKTERISTIKOS**

Medžiaga	Koncentracija
Kietosios dalelės	< 20 mg/l
Bendroji organinė anglis	< 2 mg/l
Nejonizuotas amoniakas	< 1 µg/l
Liekamasis chloras	< 10 µg/l
Bendras organinių fosforo pesticidų kiekis	< 50 ng/l
Bendras organinių fosforo pesticidų ir polichlorintų bifenilų kiekis	< 50 ng/l
Bendras organinio chloro kiekis	< 25 ng/l

## 2 priedelis

## TINKAMO ATKURTOJO BANDYMO VANDENS PAVYZDŽIAI

## ISO bandymo vanduo (1)

Pradiniai tirpalai (atskiros medžiagos)		Atkurtajam vandeniui paruošti į 1 l vandens įpilamas šis pradinių tirpalų tūris (*)
Medžiaga	Kiekis, įdedamas į 1 l vandens (*)	
Kalcio chloridas CaCl <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O	11,76 g	25 ml
Magnio sulfatas MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	4,93 g	25 ml
Natrio hidrokarbonatas NaHCO <sub>3</sub>	2,59 g	25 ml
Kalio chloridas KCl	0,23 g	25 ml

(\*) Tinkamo grynumo vanduo, pvz., dejonizuotas, distiliuotas arba atvirkštinio osmoso būdu gautas vanduo, kurio savitasis laidis būtų ne didesnis kaip 10 μS.cm<sup>-1</sup>.

## Elendt M7 ir M4 terpė

## Aklimatizavimas Elendt M7 ir M4 terpėje

Kai kurios laboratorijos turėjo sunkumų, norėdamos dafnijas perkelti tiesiai į M4 ir M7 terpes. Labiau pasisekė jas aklimatizuojant laipsniškai, t. y. perkeliant dafnijas iš jų terpės į 30 % *Elendt*, paskui į 60 % *Elendt* ir pagaliau į 100 % *Elendt*. Gali reikėti aklimatizuoti visą mėnesį.

## Ruošimas

## Mikroelementai

Atskirų mikroelementų pradiniai tirpalai (I) iš pradžių ruošiami naudojant tinkamo grynumo vandenį, pvz., dejonizuotą, distiliuotą arba atvirkštinio osmoso būdu gautą vandenį. Iš šių skirtingų tirpalų (I) ruošiamas antras pradinis tirpalas (II), turintis visus mikroelementus (sudėtinis tirpalas), t. y.:

I pradinis (-iai) tirpalas (-ai) (atskira medžiaga)	I vandeni 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 <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	57 190	20 000	1,0	0,25
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	3 040	20 000	1,0	0,25
NaBr	320	20 000	1,0	0,25
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	1 230	20 000	1,0	0,25
CuCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	335	20 000	1,0	0,25
ZnCl <sub>2</sub>	260	20 000	1,0	1,0
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	200	20 000	1,0	1,0

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
KI	65	20 000	1,0	1,0
Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	43,8	20 000	1,0	1,0
NH <sub>4</sub> VO <sub>3</sub>	11,5	20 000	1,0	1,0
Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O	5 000	2 000	—	—
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1 991	2 000	—	—

Na<sub>2</sub>EDTA ir FeSO<sub>4</sub> tirpalai ruošiami atskirai, supilami kartu ir iškart apdorojami autoklave.

Taip gaunama:

2 l Fe-EDTA tirpalas	1 000	20,0	5,0
----------------------	-------	------	-----

M4 ir M7 terpės

M4 ir M7 terpės, naudojant II pradinį tirpalą, makroelementus ir vitaminus, yra ruošiamos taip:

	Į vandenį įdėtas kiekis (mg/l)	Koncentracija (palyginti su M4 terpe) (kartų)	Terpei ruošti įpilto II pradinio tirpalo tūris (ml/l)	
			M4	M7
II pradinis tirpalas (mikro- elementų mišinys)		20	50	50
Pradiniai mitybinių ma- kroelementų tirpalai (atski- ra medžiaga)				
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	293 800	1 000	1,0	1,0
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	246 600	2 000	0,5	0,5
KCl	58 000	10 000	0,1	0,1
NaHCO <sub>3</sub>	64 800	1 000	1,0	1,0
Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> · 9H <sub>2</sub> O	50 000	5 000	0,2	0,2
NaNO <sub>3</sub>	2 740	10 000	0,1	0,1
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 430	10 000	0,1	0,1
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	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 vandens įdedant tokį 3 vitaminų kiekį:

Tiamino hidrochloridas	750	10 000		
Cianokobalaminas (B <sub>12</sub> )	10	10 000		
Biotinas	7,5	10 000		

Vitaminų mišinio pradinis tirpalas laikomas užšaldytas mažomis alikvotinėmis dalimis. Į terpę vitaminai dedami prieš pat naudojimą.

Pastaba : Jei ruošiant galutinę terpę norima išvengti druskų nuosėdų susidarymo, alikvotinės pradinio tirpalo dalys pilamos į maždaug 500–800 ml dejonizuoto vandens ir skiedžiama iki 1 litro.

Pastaba : Pirmąją publikaciją apie M4 terpę galima rasti *Elenđt, B.P. (1990). Selenium deficiency in Crustacea; an ultrastructural approach to antennal damage in Daphnia magna Straus. Protoptasma, 154, p. 25–33.*

**C.3. DUMBLIŲ INHIBAVIMO BANDYMAS****1. METODAS****1.1. ĮVADAS**

Šio bandymo tikslas yra nustatyti, kaip medžiaga veikia vienlaščių žaliųjų dumblių rūšių augimą. Per palyginti trumpai (72 valandas) truncančius bandymus galima įvertinti poveikį kelioms kartoms. Šį metodą galima pritaikyti taip, kad jį būtų galima taikyti kelioms vienlaščių dumblių rūšims, tokiu atveju su bandymo ataskaita turi būti pateiktas metodo aprašymas.

Šį metodą lengviausia taikyti vandenyje tirpioms medžiagoms, kurios bandymo sąlygomis greičiausiai lieka vandenyje.

Metodą galima taikyti medžiagoms, kurios tiesiogiai netrukdo matuoti dumblių augimo.

Prieš pradėdant bandymą, pageidautina turėti kiek galima daugiau informacijos apie medžiagos tirpumą vandenyje, garų slėgį, cheminį patvarumą, disociacijos konstantas ir biologinį skaidumą.

Planuojant bandymą ir aiškinant jo rezultatus, turi būti atsižvelgta į papildomą informaciją (pvz., struktūrinė formulė, grynumo laipsnis, reikšmingų priemaišų prigimtis ir procentinis kiekis, priedų buvimas ir jų kiekis, pasiskirstymo koeficientas (n-oktanolis/vanduo)).

**1.2. APIBRĖŽTYS IR VIENETAI**

Ląstelių tankis – ląstelių skaičius viename mililitre;

Augimas – ląstelių tankio padidėjimas per bandymo laiką,

Augimo greitis – ląstelių tankio didėjimas per laiko vienetą;

$EC_{50}$  šiame metode yra bandomosios medžiagos koncentracija, kurioje augimas ( $E_bC_{50}$ ) arba augimo greitis ( $E_rC_{50}$ ) lyginant su kontroliniu bandymu sumažėja 50 %;

NOEC (nepastebėto poveikio koncentracija) šiame metode yra didžiausia bandomoji koncentracija, kurioje žymaus augimo inhibavimo lyginant su kontroliniu bandymu nepastebėta.

Kiekviena bandomosios medžiagos koncentracija yra skaičiuojama mase tūrio vienetui (mg/litre). Ją dar galima išreikšti mase masės vienetui (mg/kg<sup>-1</sup>).

**1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS**

Kaip priemonė įrodyti, kad laboratorinėmis bandymų sąlygomis naudojamų rūšių jautrumas žymiai nepakito, gali būti atliekamas bandymas su etalonine medžiaga.

Jei naudojama etaloninė medžiaga, rezultatai turi būti pateikti bandymo ataskaitoje. Etalonine medžiaga galima naudoti kalio dichromatą, tačiau jo spalva gali turėti įtakos šviesos, kurią gauna ląstelės, kokybei ir intensyvumui bei spektrofotometrinių matavimų, jei jie daromi, rezultatams. Kalio dichromatas buvo naudojamas tarptautiniame tarplaboratoriniame bandyme (žr. 3 nuorodą ir 2 priedėlį).

**1.4. BANDYMO METODO PRINCIPAS**

Galima atlikti ribinį bandymą su 100 mg/l koncentracija, norint įrodyti, kad  $EC_{50}$  yra didesnė nei ši koncentracija.

EkspONENTIŠKAI augančios atrinktų žaliųjų dumblių kultūros kelios kartos nustatytais sąlygomis veikiamos įvairios koncentracijos bandomąja medžiaga.

Bandomieji tirpalai inkubuojami 72 valandas; per tą laiką bent kas 24 valandas kiekviename tirpale matuojamas ląstelių tankis. Nustatomas augimo inhibavimas lyginant su kultūros augimu kontroliniame bandyme.

#### 1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

Kokybės kriterijai taikomi ir ribinio bandymo metodui, ir viso bandymo metodui.

Ląstelių tankis kontrolinių bandymų kultūrose per tris paras turi būti padidėjęs bent 16 kartų.

Bandomosios medžiagos koncentracija visą bandymo laiką laikoma 80 % pradinės koncentracijos vertės ribose.

Medžiagų, kurios lengvai tirpsta bandomojoje terpėje ir kurių tirpalai patvarūs, t. y. kuriuose ištirpinta medžiaga žymiai negaruoja, nesuyra, nesihidrolizuoja arba neadsorbuojama, pradine koncentracija galima laikyti vardinę medžiagos koncentraciją. Turi būti pateikti įrodymai, kad koncentracijos buvo išlaikytos per visą bandymą ir kad kokybės kriterijai buvo įvykdyti.

Medžiagų, kurios:

- i) mažai tirpsta bandymo terpėje arba
- ii) gali sudaryti patvarias emulsijas arba dispersijas; arba
- iii) yra nepatvarios vandeniniuose tirpaluose;

pradine koncentracija laikoma koncentracija, nustatyta bandymo pradžioje. Koncentracija turi būti nustatoma po to, kai nusistovi pusiausvyra.

Visais atvejais, norint patvirtinti faktines veikimo koncentracijas arba kokybės kriterijų vykdymą, bandymo metu turi būti daromi tolesni matavimai.

Pripažįstama, kad per tą laiką, kol vyksta bandymas, didelis bandomosios medžiagos kiekis gali būti sulaikytas dumblių biomasėje. Taigi, siekiant įrodyti, kad vykdomi aukščiau minėti kokybės kriterijai, turi būti atsižvelgta ir į medžiagos kiekį, kuris patenka į dumblių biomasę, ir į medžiagos kiekį tirpale (ar, jei tai techniškai neįmanoma, į vandens tūryje nustatytą medžiagos kiekį). Tačiau, kadangi medžiagos koncentracijos dumblių biomasėje nustatymas gali kelti rimtų techninių problemų, atitiktis kokybės kriterijams gali būti įrodyta atliekant bandymą su didžiausia medžiagos koncentracija, bet be dumblių, ir išmatuojant jos koncentraciją tirpale (ar, jei tai techniškai neįmanoma, vandens tūryje) bandymo pradžioje ir pabaigoje.

#### 1.6. BANDYMO METODO APRAŠYMAS

##### 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 bandomosios koncentracijos tirpalai ruošiami alikvotinę pradinio tirpalo dalį įpilant į dumblių pradinę kultūrą (žr. 1 priedėlį).

Paprastai medžiagos turi būti bandomos tik iki tirpumo ribos. Norint užtikrinti, kad kai kurios medžiagos (pvz., vandenyje mažai tirpios medžiagos, medžiagos, kurių didelis  $P_{ow}$ , arba medžiagos, kurios sudaro patvarią dispersiją, o ne tikrąjį tirpalą vandenyje) pasiektų didžiausią tirpią/pastovią koncentraciją, galima atlikti bandymą naudojant koncentraciją, didesnę už medžiagos tirpumo ribą. Tačiau svarbu, kad tokia koncentracija kitais atžvilgiais nesutrikdytų bandymo sistemos (pvz., vandens paviršiuje nesusidarytų bandomosios medžiagos plėvelė, kuri neleistų į vandenį patekti deguoniui, ir t. t.).



Ruošiant vandenyje mažai tirpių medžiagų pradinis tirpalus arba norint pagerinti šių medžiagų dispergavimą bandomojoje terpėje, kaip pagalbines priemones galima naudoti dispergavimą ultragarsu, organinius tirpiklius, emulsiklius arba dispergentus. Kai naudojamos tokios pagalbines medžiagos, visuose bandomųjų koncentracijų tirpaluose turi būti toks pat pagalbines medžiagos kiekis, ir papildomi kontroliniai bandiniai turi būti veikiami pagalbine medžiaga, kurios koncentracija tokia pat, kaip ir bandymų serijoje. Tokių pagalbinių medžiagų koncentracija turi būti kiek įmanoma mažesnė ir jokių būdu neturi būti didesnė kaip 100 mg/litre bandomojoje terpėje.

Bandymas turi būti atliekamas nereguliuojant pH vertės. Jei yra įrodymų apie didelį 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 labai nepasikeistų. Jei reguliuojant pH įvyksta kokia nors cheminė reakcija arba bandomoji medžiaga fiziškai iškrenta į nuosėdas, tai turi būti nurodyta ataskaitoje.

#### 1.6.1.2. Bandomoji terpė

Vanduo turi būti geros kokybės distiliuotas vanduo arba dejonizuotas vanduo, kurio savitasis laidis būtų mažesnis kaip  $5\mu\text{Scm}^{-1}$ . Vandens distiliavimo aparate neturi būti jokių varinių detalių.

Rekomenduojama tokia terpė.

Pagal toliau pateiktą lentelę ruošiami keturi pradiniai tirpalai. Pradiniai tirpalai sterilizuojami filtravimu per membraną arba autoklave ir laikomi tamsoje  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  temperatūroje. Pradinis tirpalas Nr. 4 turi būti sterilizuojamas tik filtravimu per membraną. Šie pradiniai tirpalai skiedžiami, kad bandomuosiuose tirpaluose būtų gautos galutinės mitybinių medžiagų koncentracijos.

Mitybinė terpė	Koncentracija pradiniam tirpale	Galutinė koncentracija bandomajame tirpale
<b>1 pradinis tirpalas: mitybiniai makroelementai</b>		
$\text{NH}_4\text{Cl}$	1,5 g/l	15 mg/l
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1,2 g/l	12 mg/l
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,8 g/l	18 mg/l
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,5 g/l	15 mg/l
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,16 g/l	1,6 mg/l
<b>2 pradinis tirpalas: Fe-EDTA</b>		
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	80 mg/l	0,08 mg/l
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	100 mg/l	0,1 mg/l
<b>3 pradinis tirpalas: mikroelementai</b>		
$\text{H}_3\text{BO}_3$	185 mg/l	0,185 mg/l
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	415 mg/l	0,415 mg/l
$\text{ZnCl}_2$	3 mg/l	$3 \times 10^{-3}$ mg/l
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1,5 mg/l	$1,5 \times 10^{-3}$ mg/l
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,01 mg/l	10–5 mg/l
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	7 mg/l	$7 \times 10^{-3}$ mg/l
<b>4 pradinis tirpalas: <math>\text{NaHCO}_3</math></b>		
$\text{NaHCO}_3$	50 g/l	50 mg/l

Kai nusistovi pusiausvra su oru, terpės pH vertė yra lygi maždaug 8.

### 1.6.2. Aparatūra

- Įprastoji laboratorijos įranga.
- Atitinkamo tūrio bandymų kolbos (pvz., jei bandomojo tirpalo tūris 100 ml, tinka 250 ml tūrio kūginės kolbos). Visos bandymų kolbos medžiagos ir matmenų atžvilgiu turi būti vienodos.
- Kultūros auginimo aparatūra: spinta arba kamera, kurioje temperatūrą būtų galima palaikyti intervale nuo 21 °C iki 25 °C ± 2 °C tikslumu ir kurioje būtų nuolatinis tolygus apšvietimas, kurio spektrinis intervalas nuo 400 iki 700 nm. Jei dumblių kontrolinės kultūros pasiekė rekomenduojamą augimo greitį, galima daryti prielaidą, kad augimo sąlygos, įskaitant šviesos intensyvumą, buvo tinkamos.

Rekomenduojama, kad šviesos intensyvumas bandomųjų tirpalų vidutiniame lygyje būtų intervale nuo 60 iki 120  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (nuo 35 iki  $70 \times 10^{18}$  fotonų  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), kai matuojama intervale nuo 400 iki 700 nm, naudojant tinkamą imtuvą. Jei naudojami apšvietos matavimo prietaisai kalibruoti liuksais, yra priimtinas lygiavertis intervalas nuo 6 000 iki 10 000 lx.

Tokį šviesos intensyvumą galima gauti 0,35 m atstumu nuo dumblių kultūros pastačius nuo keturių iki septynių 30 W universalus tipo baltų liuminescencinių lempų (spalvos temperatūra maždaug 4 300 K).

- Ląstelių tankio matavimai turi būti daromi naudojant tiesioginį gyvų ląstelių skaičiavimo metodą, pvz., mikroskopą su skaičiavimo kamera. Tačiau gali būti naudojami kiti metodai (fotometrija, turbidimetrija,...), jei jie yra pakankamai jautrūs ir jei būtų įrodyta, kad jų rezultatai pakankamai gerai koreliuoja su ląstelių tankiu.

### 1.6.3. Bandomieji organizmai

Patariama naudoti greitai augančių žaliųjų dumblių rūšis, nes jas patogiau auginti ir bandyti. Geriausia naudoti šias rūšis:

- *Selenastrum capricornutum*, pvz., ATCC 22662 arba CCAP 278/4,
- *Scenedesmus subspicatus*, pvz., 86.81 SAG,

Pastaba.

ATCC = American Type Culture Collection (U.S.A.)

CCAP = Culture Centre of Algae and Protozoa (U.K.)

SAG = Collection of algal culture (Gottingen, F.R.G.)

Jei naudojamos kitos rūšys, turi būti nurodytas štamas.

### 1.6.4. Bandymo procedūra

Koncentracijos intervalas, kuriame tikėtinas medžiagos poveikis, nustatomas remiantis intervalo nustatymo bandymų rezultatais.

Du augimo matavimo būdai (biomasės kiekio ir augimo greičio nustatymas) gali duoti nesulyginamus augimo inhibavimo rezultatus; abu turi būti taikomi intervalo nustatymo bandyme, siekiant užtikrinti, kad geometrine progresija naudojamos koncentracijos leistų įvertinti  $E_bC_{50}$  ir  $E_rC_{50}$ .

Pradinis ląstelių tankis

Rekomenduojama, kad pradinis bandomųjų kultūrų *Selenastrum capricornutum* ir *Scenedesmus subspicatus* ląstelių tankis būtų apie  $10^4$  ląstelių/ml. Kai naudojamos kitos rūšys, biomasė turi būti panaši.

### *Bandomosios medžiagos koncentracija*

Bandymui imamos bent penkios geometrine progresija didėjančios koncentracijos, kurių santykis ne didesnis kaip 2,2. Mažiausios koncentracijos bandomoji medžiaga turi nesukelti pastebimo poveikio dumblių augimui. Didžiausios koncentracijos bandomoji medžiaga turi inhibuoti augimą bent 50 %, lyginant su kontroliniu bandymu, ir būtų geriausia, jei augimas būtų visiškai sustabdytas.

### *Lygiagrečių bandymų skaičius ir kontroliniai bandymai*

Pagal bandymo schemą su kiekviena bandomąja koncentracija turi būti atliekami trys lygiagretūs bandymai. Atliekami trys kontroliniai bandymai be bandomosios medžiagos, ir, jei tinka, atliekami dar trys kontroliniai bandymai su pagalbine medžiaga. Jei pasiteisina, bandymo schemą galima keisti didinant koncentracijų skaičių ir mažinant lygiagrečių bandymų su viena koncentracija skaičių.

### *Bandymo procedūra*

Bandomosios kultūros su reikiama bandomosios medžiagos koncentracija ir reikiamu dumblių sėjimo kultūros kiekiu ruošiamos į tinkamą kiekį dumblių pradinės kultūros pilant alikvotinį bandomosios medžiagos pradinių tirpalų tūrį (žr. 1 priedėlį).

Kolbos su kultūra supurtomos ir statomos į kultūros auginimo aparatą. Norint bandomuosiuose tirpaluose pagerinti dujų apykaitą ir sumažinti pH kitimą, dumblių ląstelės suspenduojamos tirpalus purtant, maišant arba barbotuojant per juos orą. Kultūros turi būti laikomos temperatūros intervale nuo 21 iki 25 °C, reguliuojant  $\pm 2$  °C tikslumu.

Kiekvienoje kolboje ląstelių tankis nustatomas bent po 24, 48 ir 72 valandų nuo bandymo pradžios. Kai ląstelių tankis matuojamas kitu, nei tiesioginis skaičiavimas, metodu, fonui nustatyti naudojama filtruota dumblių terpė su atitinkama bandomosios medžiagos koncentracija.

pH vertė nustatoma bandymo pradžioje ir po 72 valandų.

pH vertė kontroliniuose bandiniuose per visą bandymo laiką paprastai neturi pasikeisti daugiau kaip 1,5 vieneto.

### *Lakiųjų medžiagų bandymas*

Iki šiol nėra visuotinai priimto būdo bandyti lakiąsias medžiagas. Jei žinoma, kad medžiaga turi polinkį garuoti, galima naudoti uždaras bandymų kolbas su padidintu laisvu tūriu virš tirpalo. Skaičiuojant uždarų kolbų laisvąjį tūrį, turi būti atsižvelgta į CO<sub>2</sub> trūkumo galimybę. Buvo pasiūlyti šio metodo variantai (žr. 4 nuorodą).

Reikia stengtis nustatyti tirpale likusios medžiagos kiekį, ir patariama ypač atsargiai aiškinti bandymų rezultatus, gautus su lakiosiomis medžiagomis uždaroje sistemoje.

### *Ribinis bandymas*

Taikant šiame bandymo metode aprašytas metodikas, galima atlikti ribinį bandymą su koncentracija 100 mg/litre, kai norima įrodyti, kad EC<sub>50</sub> yra didesnė nei ši koncentracija.

Jei medžiagos prigimtis yra tokia, kad 100 mg/litre koncentracijos bandymo vandenyje pasiekti negalima, ribinis bandymas turi būti atliekamas su koncentracija, lygia medžiagos tirpumui (arba su didžiausia koncentracija, kurioje susidaro patvari dispersija) naudojamoje terpėje (dar žr. 1.6.1.1 punktą).

Turi būti atliekamas bent trigubas ribinis bandymas, toks pat turi būti ir kontrolinių bandymų skaičius. Ribiniame bandyme turi būti naudojami du augimo matavimo būdai (biomasės kiekis ir augimo greitis).

Jei ribiniame bandyme, lyginant su kontroliniu bandymu, nustatomas 25 % arba didesnis vidutinis biomasės kiekio mažėjimas arba augimo greičio mažėjimas, turi būti atliekamas visas bandymas.

## 2. DUOMENYS IR VERTINIMAS

Išmatuotas ląstelių tankis bandomosiose kultūrose ir kontroliniuose bandiniuose, kartu su bandomosios medžiagos koncentracijomis ir matavimo laikais pateikiamas lentelėje. Norint gauti augimo kreives, vidutinė ląstelių tankio vertė kiekvienai bandomosios medžiagos koncentracijai ir kontroliniuose bandiniuose vaizduojama grafiškai laiko atžvilgiu (0–72 h).

Turi būti taikomi du toliau pateikti būdai, kad būtų galima įvertinti koncentracijos ir jos poveikio priklausomybę. Kai kurios medžiagos augimą gali skatinti būdamos mažos koncentracijos. Turi būti įskaitomi tik tie duomenų taškai, kuriuose inhibavimas kinta nuo 0 iki 100 %.

### 2.1. PLOTŲ PO AUGIMO KREIVĖMIS LYGINIMAS

Plotas tarp augimo kreivės ir horizontaliosios tiesės  $N = N_0$  gali būti apskaičiuotas taikant formulę:

$$A = \left( \frac{N_1 - N_0}{2} \right) \times t_1 + \left( \frac{N_1 + N_2 - 2N_0}{2} \right) \times (t_2 - t_1) + \dots + \left( \frac{N_{n-1} + N_n - 2N_0}{2} \right) \times (t_n - t_{n-1})$$

čia:

A = plotas

$N_0$  = ląstelių skaičius/ml laiku  $t_0$  (bandymo pradžia)

$N_1$  = išmatuotas ląstelių skaičius/ml laiku  $t_1$

$N_n$  = išmatuotas ląstelių skaičius/ml laiku  $t_n$

$t_1$  = pirmojo matavimo laikas nuo bandymo pradžios

$t_n$  = n-tojo matavimo laikas nuo bandymo pradžios

n = nuo bandymo pradžios darytų matavimų skaičius

Ląstelių augimo inhibavimo procentinė vertė kiekvienai bandomosios medžiagos koncentracijai ( $I_A$ ) apskaičiuojama taikant formulę:

$$I_A = \left( \frac{A_c - A_t}{A_c} \right) \times 100$$

čia:

$A_c$  = plotas tarp augimo kreivės, gautos kontroliniame bandyme, ir horizontaliosios tiesės  $N = N_0$

$A_t$  = plotas tarp augimo kreivės, gautos koncentracijai t, ir horizontaliosios tiesės  $N = N_0$

$I_A$  = vertės atitinkamų koncentracijų atžvilgiu brėžiamos pusiau logaritminiam arba pusiau logaritminiam tikimybiniam popieriui. Jei vertės brėžiamos tikimybiniam popieriui, per taškus vedama tiesė, arba iš akies arba skaičiuojant pagal regresijos lygtį.

$EC_{50}$  įvertinama iš regresijos tiesės arba kaip koncentracijos rodmuo, kuris atitinka 50 % inhibavimą ( $I_A = 50$  %). Norint šiuo skaičiavimo metodu gautą vertę nurodyti vienareikšmiškai, siūloma vartoti simbolį  $E_bC_{50}$ . Svarbu, kad  $E_bC_{50}$  būtų nurodomas kartu su atitinkamu veikimo laikotarpiu, pvz.,  $E_bC_{50}$  (0–72 h).

### 2.2. AUGIMO GREIČIŲ LYGINIMAS

Vidutinis eksponentiškai augančių kultūrų savitasis augimo greitis ( $\mu$ ) gali būti apskaičiuotas pagal formulę:

$$\mu = \left( \frac{\ln N_n - \ln N_0}{t_n - t_0} \right)$$

čia  $t_0$  bandymo pradžios laikas.

Kitaip vidutinio savitojo augimo greičio vertė gali būti gauta iš regresijos tiesės kampinio koeficiento N priklausomybės nuo laiko grafike.

Savitojo augimo greičio mažėjimo procentinė vertė kiekvienai bandomosios medžiagos koncentracijai ( $I_{\mu t}$ ) skaičiuojama pagal formulę:

$$I_{\mu t} = \left( \frac{\mu_c - \mu_t}{\mu_c} \right) \times 100$$

čia:

$\mu_c$  = vidutinis savitasis augimo greitis kontroliniame bandyme

$\mu_t$  = vidutinis savitasis augimo greitis, kai bandomoji koncentracija t

Kiekvienai bandomosios medžiagos koncentracijai gautos savitojo augimo greičio mažėjimo vertės ir kontrolinės greičio vertės santykio procentinė vertė brėžiama koncentracijos logaritmo atžvilgiu. Iš gauto grafiko galima gauti  $EC_{50}$  vertę. Norint šiuo skaičiavimo metodu gautą vertę nurodyti vienareikšmiškai, siūloma vartoti simbolį  $E_rC_{50}$ . Turi būti nurodytas matavimo laikas, pvz., jei vertė gauta 0 ir 72 valandų laikotarpiu, vartojamas simbolis  $E_rC_{50}$  (0–72 h).

*Pastaba.* Savitasis augimo greitis yra logaritminis dydis, ir nedideli augimo greičio pokyčiai gali būti didelių biomasės pokyčių priežastimi. Taigi,  $E_bC$  ir  $E_rC$  skaitmeninės vertės nėra palyginamos.

### 2.3. NOEC SKAIČIAVIMAS

NOEC (angl. *No Observed Effect Concentration*, nepastebėto poveikio koncentracija) nustatoma pagal atitinkamą didelio skaičiaus bandinių lyginimo statistinę metodiką (pvz., dispersinė analizė ir Dunnetto testas), naudojant lygiagrečiuose bandymuose gautas atskiras ploto po augimo kreivę vertes A (žr. 2.1 punktą) arba savituosius augimo greičius  $\mu$  (žr. 2.2 punktą).

### 3. ATASKAITA

Bandymo ataskaitoje pateikiama, jei įmanoma, tokia informacija:

- bandomoji medžiaga – cheminio identifikavimo duomenys,
- bandomieji organizmai – kilmė, laboratorinė kultūra, štamo numeris, auginimo metodas,
- bandymo sąlygos:
  - bandymo pradžios ir pabaigos data bei jo trukmė,
  - temperatūra,
  - terpės sudėtis,
  - kultūros auginimo aparatūra,
  - tirpalų pH bandymo pradžioje ir pabaigoje (turi būti pateiktas aiškinimas, jei stebimas pH vertės nukrypimas yra didesnis nei 1,5 vieneto),
  - nešiklis ir metodas, taikytas bandomajai medžiagai ištirpinti, bei nešiklio koncentracija bandomuosiuose tirpaluose,
  - šviesos intensyvumas ir kokybė,
  - bandomosios koncentracijos (matuotos arba vardinės).
- rezultatai:
  - ląstelių tankis kiekvienoje kolboje bei kiekviename matavimo taške, taip pat ląstelių tankio nustatymo metodas,

- ląstelių tankio vidutinės vertės,
- augimo kreivės,
- koncentracijos ir poveikio priklausomybės grafinis vaizdavimas,
- EC vertės ir skaičiavimo metodas,
- NOEC,
- kitoks pastebėtas poveikis.

#### 4. NUORODOS

- 1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 201, Decision of the Council C(81) 30 Final.
- 2) Umweltbundesamt, Berlin, 1984, Verfahrensvorschlag „Hemmung der Zellvermehrung bei der Grünalge *Scenedesmus subspicatus*“, in: Rudolph/Boje: bkotoxikologie, ecomed, Landsberg, 1986.
- 3) ISO 8692- Water quality -Fresh water algal growth inhibition test with *Scenedesmus subspicatus* and *Selenastrum capricornutum*.
- 4) S. Galassi and M. Vighi -Chemosphere, 1981, vol.10, p. 1123–1126.

## 1 priedėlis

**Dumблиų auginimo metodikos pavyzdys****Bendrosios pastabos**

Šio kultūros auginimo pagal pateikiamą metodiką tikslas yra gauti dumблиų kultūras toksiškumo bandymams.

Norint užtikrinti, kad dumблиų kultūros nebūtų užkrėstos bakterijomis, turi būti naudojami tinkami metodai (ISO 4833). Gali būti tinkama naudoti akseniškas kultūras, tačiau būtinos yra vienlaščių dumблиų kultūros.

Visi veiksmai turi būti atliekami steriliomis sąlygomis, kad nebūtų užkrėsta bakterijomis ir kitais dumблиais. Užkrėstų kultūrų turi būti atsisakyta.

**Dumблиų kultūros auginimo metodikos***Mitybinių tirpalų (terpės) ruošimas*

Terpė gali būti paruošta skiedžiant pradinis mitybinių medžiagų koncentruotus tirpalus. Kietai terpei gauti dedama 0,8 % agaro. Naudojama terpė turi būti sterili. Sterilizuojant autoklave, galima prarasti NH<sub>3</sub>.

*Pradinė kultūra*

Pradinės kultūros yra mažos dumблиų kultūros, kurios reguliariai pernešamos į šviežią terpę, kad jas būtų galima naudoti kaip pradinę bandymo medžiagą. Jei kultūros reguliariai nenaudojamos, jos užnešamos ant gulsčiojo agaro mėgintuvėliuose. Šios kultūros pernešamos į šviežią terpę bent kartą per du mėnesius.

Pradinės kultūros auginamos kūginėse kolbose su atitinkama terpe (tūris apie 100 ml). Kai dumблиai inkubuojami 20 °C temperatūroje su nuolatiniu apšvietimu, pernešti reikia kas savaitę.

Į kolbą su šviežia terpe sterilia pipete pernešamas toks „senos“ kultūros kiekis, kad greitai augančių rūšių atveju pradinė koncentracija būtų maždaug 100 kartų mažesnė nei senos kultūros.

Rūšių 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 prieš tai, kai kultūra pasiekia žūties tarpsnį.

*Iš anksto paruošta kultūra*

Iš anksto paruošta kultūra skirta tam, kad būtų gautas bandomosioms kultūroms sėti reikalingas dumблиų kiekis. Iš anksto paruošta kultūra inkubuojama bandymo sąlygomis ir naudojama tuomet, kai dar auga eksponentiškai, paprastai maždaug po trijų inkubavimo parų. Kai dumблиų kultūroje pasitaiko deformuotos arba nenormalios ląstelės, jos turi būti pašalintos.

## 2 priedėlis

ISO 8692 – Vandens kokybė – Gėlojo vandens dumблиų augimo inhibavimo bandymas su *Scenedesmus subspicatus* ir *Sele-nastrum capricornutum* pateikia šiuos tarplaboratorinio lyginimo bandymo rezultatus, gautus iš 16 laboratorijų, tyrusių kalio dichromatą:

	Vidutinė vertė (mg/l)	Intervalas (mg/l)
E <sub>r</sub> C <sub>50</sub> (0–72 h)	0,84	0,60–1,03
H <sub>b</sub> C <sub>50</sub> (0–72 h)	0,53	0,20–0,75

## C.4. LENGVO BIOLOGINIO SKAIDUMO MATAVIMAS

## I DALIS. BENDRIEJI KLAUSIMAI

## I.1. ĮVADAS

Aprašyti šeši metodai, kurie leidžia tirti cheminių medžiagų biologinio skaidumo lengvumą aerobinėje vandenyje terpėje:

- Ištirpusios organinės anglies (DOC) išnykimo (Die-Away) (C.4-A metodas);
- Modifikuotas OECD (*Organization for Economic Cooperation and Development* – Ekonominio bendradarbiavimo ir plėtros organizacija) atrankos bandymas – DOC išnykimas (C.4-B metodas);
- Anglies dioksido (CO<sub>2</sub>) išsiskyrimas (modifikuotas Sturm bandymas) (C.4-C metodas);
- Manometrinė respirometrija (C.4-D metodas);
- Uždarnosios kolbos (*closed bottle*) metodas (C.4-E metodas);
- MITI (*Ministry of International Trade and Industry* (Tarptautinės prekybos ir pramonės ministerija) – Japonija) (C.4-F metodas).

Bendrieji ir įprastieji visų šešių bandymų klausimai pateikti metodo I dalyje. Atskiriems metodams specifiniai klausimai pateikti II–VII dalyse. Priedėliuose pateikiamos apibrėžtys, formulės ir rekomendacijos.

OECD tarplaboratorinio lyginimo bandymai, atlikti 1988 m. parodė, kad šiais metodais gauti rezultatai yra suderinami. Tačiau priklausomai nuo fizikinių bandomosios medžiagos savybių, pirmenybė gali būti teikiama vienam arba kitam metodui.

## I.2. TINKAMO METODO PARINKIMAS

Norint parinkti tinkamiausią metodą, labai svarbi yra informacija apie cheminės medžiagos tirpumą, garų slėgį ir adsorbcijos charakteristikas. Turi būti žinoma cheminė medžiagos struktūra arba formulė, norint skaičiuoti teorines vertes ir (arba) tikrinti išmatuotas parametrų vertes, pvz., ThOD, ThCO<sub>2</sub>, DOC, TOC, COD (žr. 1 ir 2 priedėlius).

Bandomosios cheminės medžiagos, kurių tirpumas vandenyje yra bent 100 mg/l, ir jei jos nėra lakios ir neadsorbuojamos, gali būti įvertintos visais metodais. Toms cheminėms medžiagoms, kurios mažai tirpsta vandenyje, yra lakios arba yra adsorbuojamos, tinkami metodai nurodyti 1 lentelėje. Būdas, kaip reikia elgtis su mažai vandenyje tirpiomis ir lakiomis medžiagomis, yra aprašytas 3 priedėlyje. Vidutiniškai lakios cheminės medžiagos gali būti bandomos DOC išnykimo metodu, jei bandymo induose (kurie turi būti tinkamai užkimšti) dujomis yra pakankamai vietos. Šiuo atveju turi būti įdiegta abiotinė kontrolė, kad būtų galima atsizvelgti į bet kokius fizinius nuostolius.

1 lentelė

## Bandymo metodų tinkamumas

Bandymas	Analizės metodas	Tinkamumas medžiagoms, kurios yra:		
		mažai tirpios	lakios	adsorbuojamos
DOC išnykimas	Ištirpusi organinė anglis	—	—	+/-
Modifikuotas OECD atrankos bandymas – DOC išnykimas	Ištirpusi organinė anglis	—	—	+/-
CO <sub>2</sub> išsiskyrimas	Respirometrija: CO <sub>2</sub> išsiskyrimas	+	—	+
Manometrinė respirometrija	Manometrinė respirometrija: deguonies suvartojimas	+	+/-	+



Bandymas	Analizės metodas	Tinkamumas medžiagoms, kurios yra:		
		mažai tirpios	lakios	adsorbuojamos
Uždarnosios kolbos	Respirometrija: ištirpęs deguonis	+/-	+	+
MITI	Respirometrija: deguonies suvartojimas	+	+/-	+

Norint aiškinti gautus rezultatus, ypač kai rezultatai yra žemi arba ribiniai, reikalinga informacija apie bandomosios medžiagos grynumą arba apie pagrindinių komponentų santykinę dalį.

Informacija apie bandomųjų medžiagų toksiškumą bakterijoms (4 priedėlis) gali būti labai naudinga, kai reikia pasirinkti tinkamas bandomąsias koncentracijas, ir gali būti esminė, kai reikia teisingai paaiškinti, kodėl biologinio skaidymo vertės yra mažos.

### I.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Norint tikrinti metodiką, lygiagrečiai įprastiems bandymams tinkamai paruoštoje kolboje bandomos etaloninės medžiagos, kurios atitinka lengvo biologinio skaidumo kriterijus.

Tinkamos cheminės medžiagos yra anilinas (šviežiai distiliuotas), natrio acetatas ir natrio benzoatas. Visos šios etaloninės medžiagos skaidomos šių bandymų sąlygomis, net jei sėjimo kultūra ir nėra specialiai įdėta.

Buvo siūloma, kad reikėtų rasti etaloninę medžiagą, kuri būtų lengvai biologiškai skaidoma, tačiau tik kai yra įdėta sėjimo kultūros. Buvo pasiūlytas kalio hidroftalatas, tačiau prieš priimant jį kaip etaloninę medžiagą, reikia apie šią medžiagą surinkti daugiau duomenų.

Respirometriniuose bandymuose junginiai su azotu gali turėti įtakos deguonies suvartojimui dėl nitrifikavimo (žr. 2 ir 5 priedėlius).

### I.4. BANDYMO METODO PRINCIPAS

Į bandomosios medžiagos tirpalą arba suspensiją mineralinėje terpėje dedama sėjimo kultūra ir tirpalas inkubuojamas aerobinėmis sąlygomis tamsoje arba išsklaidytoje šviesoje. Sėjimo kultūros DOC kiekis bandomosios medžiagos tirpale turi būti kiek įmanoma mažesnis lyginant su bandomosios medžiagos DOC kiekiu. Atsižvelgiama į sėjimo kultūros endogeninį aktyvumą, lygiagrečiai atliekant tuščiuosius bandymus su sėjimo kultūra, bet be bandomosios medžiagos, nors ląstelių endogeninis aktyvumas, kai yra bandomosios medžiagos, nevisiškai tiksliai atitinka aktyvumą endogeninio aktyvumo kontroliniame bandyme. Metodikų veikimui tikrinti lygiagrečiai atliekamas bandymas su etalonine medžiaga.

Paprastai skaidymo eiga sekama nustatant parametrus, pvz., DOC, CO<sub>2</sub> susidarymą ir deguonies suvartojimą; matavimai daromi pakankamai dažnai, kad galima būtų nustatyti biologinio skaidymo pradžią ir pabaigą. Jei naudojami automatiniai respirometrai, matavimas yra nepertraukiamas. Kai matuojamas kitas parametras, kartais papildomai matuojama DOC, tačiau tai paprastai daroma tik bandymo pradžioje ir pabaigoje. Galima naudoti specifinę cheminę analizę, kai norima įvertinti pradinį bandomosios medžiagos skaidymą ir nustatyti bet kurios susidariusios tarpinės medžiagos koncentraciją (privaloma MITI bandyme).

Paprastai bandymas tęsiamas 28 paras. Tačiau bandymą galima baigti anksčiau nei po 28 parų, t. y. kai biologinio skaidymo kreivė pasiekia gulsčiąją dalį bent po trijų matavimų. Bandymai gali būti pratęsti ir atliekami ilgiau nei 28 paras, kai kreivė rodo, kad biologinis skaidymas prasidėjo, tačiau 28 parą gulsčioji dalis dar nepasiekta.

### I.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

#### I.5.1. Atkuriamumas

Dėl biologinio skaidymo prigimties ir dėl mišrios bakterijų populiacijų, naudojamos kaip sėjimo kultūros, sudėties matavimai turi būti daromi bent du kartus.

Bendra patirtis rodo, kad, kuo didesnė bandymo pradžioje į bandomąją terpę įdėtų mikroorganizmų koncentracija, tuo mažesnė bus lygiagrečių bandymų sklaida. Tarplaboratorinio lyginimo bandymai taip pat parodė, kad gali labai skirtis rezultatai, gauti skirtingose laboratorijose, tačiau lengvai biologiškai skaidomų junginių atveju rezultatai paprastai yra pakankamai panašūs.

### 1.5.2. Bandymo tinkamumas

Bandymas yra tinkamas, jei skirtumas tarp bandomosios medžiagos šalinimo pakartotinai gautų kraštinių verčių gulsčioje kreivės dalyje, bandymo pabaigoje arba 10 parų lango pabaigoje, kai tinkama, yra mažesnis kaip 20 %, ir jei etaloninės medžiagos skaidymo procentinė vertė iki 14 paros pasiekė lengvo biologinio skaidumo lygį. Jei kuri nors iš šių sąlygų neįvykdyta, bandymas turi būti pakartotas. Dėl metodų tikslumo mažos vertės nebūtinai reiškia, kad bandomoji medžiaga aplinkos sąlygomis biologiškai neskaidi, tačiau jos rodo, kad biologiniam skaidumui nustatyti būtina tęsti darbą.

Jei toksiškumo bandyme, kuriame naudojama ir bandomoji medžiaga, ir etaloninė cheminė medžiaga, skaidymas po 14 parų yra mažesnis kaip 35 % (pagal DOC) arba mažesnis kaip 25 % (pagal ThOD arba  $\text{ThCO}_2$ ), bandomosios cheminės medžiagos gali būti laikomos inhibuojančiomis (dar žr. 4 priedėlį). Bandymų serijos turi būti pakartotos, jei įmanoma, naudojant mažesnę bandomosios medžiagos koncentraciją ir (arba) didesnę sėjimo kultūros koncentraciją, tačiau ne didesnę kaip 30 mg kietųjų dalelių/litre.

### 1.6. BENDROSIOS METODIKOS IR PREPARATAI

Bendrosios bandymų sąlygos apibendrintos 2 lentelėje. Aparatūra ir kitos eksperimento sąlygos, specifiskai siejamos su atskiru bandymu, aprašytos toliau pateiktame to bandymo aprašyme.

2 lentelė

#### Bandymų sąlygos

Bandymas	DOC išnykimas	CO <sub>2</sub> išsiskyrimas	Manometrinė respirometrija	OECD atrankos bandymas	Uždarnosios kolbos bandymas	MITI (l)
Bandomosios medžiagos koncentracija mg/l			100		2–10	100
mg DOC/l	10–40	10–20		10–40		
mg ThOD/l			50–100		5–10	
Sėjimo kultūros koncentracija (ląstelių/l, apytikriai)	≤ 30 mg/l SS arba ≤ 100 ml ištakio/l ( $10^{7-1}0^8$ )			0,5 ml anterinio ištakio/l ( $10^5$ )	≤ 5 ml ištakio/l ( $10^{4-1}0^6$ )	30 mg/l SS ( $10^{7-1}0^8$ )
Elementų koncentracija mineralinėje terpėje						
P	116				11,6	29
N	1,3				0,13	1,3
Na	86				8,6	17,2
K	122				12,2	36,5
Mg	2,2				2,2	6,6
Ca	9,9				9,9	29,7
Fe	0,05–0,1				0,05–0,1	0,15
pH	7,4 ± 0,2					geriau 7,0

Bandymas	DOC išnykimas	CO <sub>2</sub> išsiskyrimas	Manometrinė respirometrija	OECD atrankos bandymas	Uždarnosios kolbos bandymas	MITI (l)
Temperatūra	22 ± 2 °C					25 ± 1 °C
DOC = ištirpusi organinė anglis			ThOD = teorinis deguonies suvartojimas		SS = Suspenduotos kietosios dalelės	

#### 1.6.1. Skiedimo vanduo

Naudojamas dejonizuotas arba distiliuotas vanduo, kuriame nebūtų inhibuojančios koncentracijos nuodingųjų medžiagų (pvz., Cu<sup>2+</sup> jonų). Vandenyje organinės anglies neturi būti daugiau kaip 10 % to kiekio, kuris yra bandomojoje medžiagoje. Didelis bandymo vandens grynumas reikalingas tam, kad būtų eliminuotos didelės tuščiųjų bandinių vertės. Užterštumas gali atsirasti dėl vandeniui būdingų priemaišų ir dėl jonitinių dervų bei bakterijų ir dumblių irimo produktų. Kiekvienoje bandymų serijoje naudokite tik vienos partijos vandenį, iš anksto patikrintą atliekant DOC analizę. Toks tikrinimas nėra būtinas uždarnosios kolbos bandyme, tačiau vandens suvartojamas deguonies kiekis turi būti mažas.

#### 1.6.2. Pradiniai mineralinių komponentų tirpalai

Norint ruošti bandomuosius tirpalus, ruošiami atitinkamų koncentracijų mineralinių komponentų pradiniai tirpalai. DOC išnykimo, modifikuotos OECD atrankos, CO<sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                                  | 8,50 g  |
|    | kalio hidrofosfatas, K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                                    | 21,75 g |
|    | natrio hidrofosfatas, dihidratas, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O | 33,40 g |
|    | Amonio chloridas NH <sub>4</sub> Cl   | 0,50 g  |
|    | Ištirpinkite vandenyje ir praskieskite iki 1 litro. Tirpalo pH turi būti 7,4.           |         |
| b) | kalcio chloridas, bevandenis, CaCl <sub>2</sub>   | 27,50 g |
|    | arba kalcio chloridas, dihidratas, CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O               | 36,40 g |
|    | Ištirpinkite vandenyje ir praskieskite iki 1 litro                                      |         |
| c) | magnio sulfatas, heptahidratas, MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O                  | 22,50 g |
|    | Ištirpinkite vandenyje ir praskieskite iki 1 litro                                      |         |
| d) | geležies (III) chloridas, heksahidratas, FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O          | 0,25 g  |
|    | Ištirpinkite vandenyje ir praskieskite iki 1 litro                                      |         |

*Pastaba.* Jei nenorite ruošti šio tirpalo prieš patį bandymą, vienam tirpalo litrui įlašinkite vieną lašą konc. HCl arba įdėkite 0,4 g etilendiamintetraacto rūgšties dinatrio druskos (EDTA).

#### 1.6.3. Cheminių medžiagų pradiniai tirpalai

Pavyzdžiui, dejonizuotame vandenyje ištirpinkite 1–10 g (kiek reikia) bandomosios arba etaloninės medžiagos ir skieskite iki 1 litro, jei tirpumas didesnis kaip 1 g/l. Pagal kitą būdą pradinius tirpalus ruoškite mineralinėje terpėje arba cheminę medžiagą dėkite tiesiai į mineralinę terpę. Kaip ruošti mažiau tirpias chemines medžiagas, žr. 3 priedėlį, tačiau MITI bandyme (C.4-F metodas) nei tirpikliai, nei emulsikliai neturi būti naudojami.

#### 1.6.4. Sėjimo kultūros

Sėjimo kultūrą galima gauti iš įvairių šaltinių: aktyvūs dumblas, nuotekų ištakiai (nechloruoti), paviršiniai vandenys ir dirvožemiai, arba mišiniai iš šių šaltinių. Jei DOC išnykimo, CO<sub>2</sub> išsiskyrimo ir manometrinės respirometrijos bandymams naudojamas aktyvūs 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.

##### 1.6.4.1. Sėjimo kultūra iš aktyviųjų dumblų

Iš daugiausia buitines nuotekas valančio valymo įrenginio arba laboratorinio valymo įrenginio aeravimo talpos surinkite šviežią aktyviojo dumblo bandinį. Prireikus stambias daleles šalinkite filtruodami per tankų tinklinį filtrą ir toliau dumblą laikykite aerobinėmis sąlygomis.

Kita galimybė – pašalinę visas stambias daleles, leiskite dumblui nusistovėti arba centrifuguokite (pvz., 10 min veikiant 100 g). Skystį nuo dumblo pilkite lauk. Dumblą galite plauti mineraline terpe. Suspenduokite koncentruotą dumblą mineralinėje terpėje, kad suspenduotų kietųjų dalelių koncentracija būtų 3–5 g/l, ir aeruokite tol, kol dumblą panaudosite.

Dumblas turi būti imamas iš gerai veikiančio standartinio įrenginio. Jei dumblą reikia imti iš didelio našumo valymo įrenginio, arba, jei manoma, kad dumble yra inhibitorių, jis turi būti plaunamas. Gerai sumaišytą, pakartotinai suspenduotą dumblą palikite nusistovėti arba centrifuguokite, nupilkite nuo jo skystį ir išplautą dumblą dar kartą suspenduokite kitame mineralinės terpės tūryje. Šiuos veiksmus kartokite tol, kol bus galima manyti, kad substrato pertekliaus arba inhibitorių neliko.

Prieš pat dumblo naudojimą, paimkite vėl visiškai suspenduoto arba neapdoroto dumblo bandinį sausų suspenduotų kietųjų dalelių masei nustatyti.

Pagal kitą būdą galima homogenizuoti aktyvųjį dumblą (3–5 g/l suspenduotų kietųjų dalelių). Maišykite dumblą 2 min. vidutiniu greičiu mechaniniame maišiklyje. Palikite sumaišytą dumblą 30 min. arba ilgiau, jei to reikia, ir dekantaukite skystį, kurį naudosite kaip sėjimo kultūrą, pagal normą 10 ml/l mineralinės terpės.

##### 1.6.4.2. Kiti sėjimo kultūros šaltiniai

Ją galima gauti iš valymo įrenginio arba laboratorinio valymo įrenginio, apdorojančių daugiausia buitines nuotekas, antrinio ištakio. Paimkite šviežią bandinį ir, kol gabenate, laikykite jį aerobinėmis sąlygomis. Palikite nusistovėti 1 h arba filtruokite per stambų filtrinį popierių, ir dekantuoatą ištakį arba filtratą laikykite aerobinėmis sąlygomis, kol naudosite. Vienam litrui mineralinės terpės galima naudoti iki 100 ml šios rūšies sėjimo kultūros.

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.

#### 1.6.5. Sėjimo kultūrų pradinis kondicionavimas

Sėjimo kultūros gali būti iš anksto kondicionuojamos eksperimento sąlygomis, tačiau iš anksto prie bandomosios cheminės medžiagos neadaptuojamos. Pradinis kondicionavimas susideda iš aktyviojo dumblo tirpalo mineralinėje terpėje arba antrinio ištakio 5–7 parų trukmės aeravimo bandymo temperatūroje. Kartais pradinis kondicionavimas gerina bandymo metodų preciziškumą, nes sumažina tuščiųjų bandinių vertes. Laikoma, kad MITI bandymo sėjimo kultūrai pradinis kondicionavimas nebūtinai.

#### 1.6.6. Abiotinio skaidymo kontroliniai bandiniai

Kai reikia, nustatykite galimą bandomosios medžiagos abiotinį skaidymą, matuodami DOC pašalinimą, deguonies suvartojimą arba anglies dioksido išsiskyrimą steriliuose kontroliniuose bandiniuose be sėjimo kultūros. Sterilizuokite filtruodami per membraną (0,2–0,45 μm) arba pridėkite reikiamos koncentracijos tinkamos toksinės medžiagos. Jei naudojamas filtravimas per membraną, sterilumui užtikrinti bandinius imkite aseptiniu būdu. Jei bandomosios medžiagos adsorbcijos galimybė nebuvo iš anksto atmesta, bandymai, kuriuose biologinis skaidymas nustatomas matuojant DOC šalinimą, ypač jei sėjimo kultūra iš aktyviojo dumblo, turi būti su abiotinio skaidymo kontroliniu bandiniu, į kurį dedama sėjimo kultūra ir nuodijama.

### I.6.7. Kolbų skaičius

Kolbų skaičius tipiniame bandyme nurodytas skyriuje su atitinkamo metodo aprašymu. Galima naudoti tokio tipo kolbas:

- bandomoji suspensija: su bandomąja medžiaga ir sėjimo kultūra,
- sėjimo kultūros tuščiasis bandinys: tik su sėjimo kultūra,
- metodikos tikrinimo bandinys: su etalonine medžiaga ir sėjimo kultūra,
- abiotinio skaidymo sterilus kontrolinis bandinys: sterilus, su bandomąja medžiaga (žr. I.6.6),
- adsorbcijos kontrolinis bandinys: su bandomąja medžiaga, sėjimo kultūra ir sterilizavimo medžiaga,
- toksiskumo kontrolinis bandinys: su bandomąja medžiaga, etalonine medžiaga ir sėjimo kultūra.

Būtina, kad nustatymas bandomojoje suspensijoje ir sėjimo kultūros tuščiajame bandinyje būtų daromas lygiagrečiai. Patartina matavimus kitose kolbose taip pat daryti lygiagrečiai.

Tačiau tai ne visuomet gali būti įmanoma. Užtikrinkite, kad būtų paimtas pakankamas skaičius bandinių arba padaryta matavimų, norint įvertinti pašalinimo procentinę vertę po 10 parų lango.

### I.7. DUOMENYS IR VERTINIMAS

Skaičiuojant skaidymo procentinę vertę,  $D_t$ , naudojamos vidutinės vertės dviejų parametro matavimų bandymų induose ir tuščiajame bandinyje su sėjimo kultūra. Formulės pateiktos kituose konkrečius bandymus aprašančiuose skyriuose. Skaidymo eiga vaizduojama grafiškai ir pažymima 10 parų langas. Apskaičiuokite ir pateikite medžiagos šalinimo, baigiantis 10 parų langui, procentinę vertę ir gulsčiąją kreivės dalį atitinkančią vertę arba bandymo pabaigos vertę, kuri tinka.

Respirometriniuose bandymuose junginiai, turintys azoto, gali turėti įtakos deguonies suvartojimui dėl nitrifikavimo (žr. 2 ir 5 priedėlius).

#### I.7.1. Skaidymas, nustatomas pagal DOC kiekio matavimą

Skaidymo procentinė vertė  $D_t$  kiekvieną kartą, kai paimamas bandinys, turi būti skaičiuojama atskirai kolboms su bandomąja medžiaga, naudojant dviejų DOC matavimų vidutines vertes, kad būtų galima įvertinti bandymo tinkamumą (žr. I.5.2.). Skaidymas skaičiuojamas pagal lygtį:

$$D_t = \left( 1 - \frac{(C_t - C_{bt})}{(C_o - C_{bo})} \right) \times 100$$

čia:

$D_t$  = skaidymo % laiku  $t$ ,

$C_o$  = vidutinė pradinė DOC koncentracija terpėje su bandomąja medžiaga ir sėjimo kultūra (DOC mg/l),

$C_t$  = vidutinė DOC koncentracija terpėje su bandomąja medžiaga ir sėjimo kultūra laiku  $t$  (DOC mg/l),

$C_{bo}$  = vidutinė pradinė DOC koncentracija tuščiojo bandinio terpėje su mineraline sėjimo kultūra (DOC mg/l),

$C_{bt}$  = vidutinė DOC koncentracija tuščiojo bandinio terpėje su mineraline sėjimo kultūra laiku  $t$  (DOC mg/l).

Visos koncentracijos nustatomos eksperimentiškai.

**1.7.2. Skaidymas, nustatomas atliekant specifinę analizę**

Kai yra specifinės analizės duomenys, pradinis biologinis skaidymas skaičiuojamas pagal formulę:

$$D_t = \left( \frac{S_b - S_a}{S_b} \right) \times 100$$

čia:

$D_t$  = skaidymo % laiku  $t$ , paprastai 28 paros,

$S_a$  = likutinis bandomosios medžiagos kiekis terpėje su sėjimo kultūra bandymo pabaigoje (mg),

$S_b$  = likutinis bandomosios medžiagos kiekis tuščiajame bandinyje su vandeniu (terpe), į kurį buvo įdėta tik bandomoji medžiaga (mg).

**1.7.3. Abiotinis skaidymas**

Naudojant sterilų kontrolinį bandinį abiotiniam skaidymui nustatyti, abiotinio skaidymo procentinė vertė skaičiuojama pagal formulę:

$$\text{Abiotinio skaidymo \%} = \left( \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \right) \times 100$$

čia:

$C_{s(o)}$  = DOC koncentracija steriliame kontroliniame bandinyje 0 parą

$C_{s(t)}$  = DOC koncentracija steriliame kontroliniame bandinyje  $t$  parą

**1.8. ATASKAITA**

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

- bandomoji ir etaloninė cheminė medžiaga, jų grynumas,
- bandymo sąlygos,
- sėjimo kultūra: prigimtis ir ėmimo vieta (-os), koncentracija ir bet koks pradinis kondicionavimas,
- nuotekose esančių pramoninių nuotekų dalis ir prigimtis, jei tai žinoma,
- bandymo trukmė ir temperatūra,
- apdorojimo būdas mažai tirpių cheminių medžiagų atveju,
- taikytas bandymo metodas; būtina moksliskai pagrįsti ir paaiškinti bet kokią metodikos keitimą,
- specifikacija,
- visi stebėti inhibavimo reiškiniai,
- bet koks stebimas abiotinis skaidymas,
- specifinės cheminės analizės duomenys, jei yra,
- analiziniai duomenys apie tarpinius produktus, jei yra,

- bandomosios medžiagos ir etaloninės medžiagos skaidymo procentinės dalies kitimo laike grafikas; turi būti aiškiai nurodyta vėlavimo fazė, skaidymo fazė, 10 parų langas ir kreivės krypties koeficientas (1 priedėlis). Jei bandymas atitinka tinkamumo kriterijus, grafikui sudaryti galima naudoti skaidymo procentinių verčių vidutines vertes, gautas kolbose su bandomąja medžiaga,
- šalinimo procentinė dalis po 10 parų lango ir kreivės gulsčioje dalyje arba bandymo pabaigoje.

## II DALIS. **DOC IŠNYKIMO BANDYMAS** (C.4-A metodas)

### II.1. BANDYMO METODO PRINCIPAS

Išmatuotas mineralinės terpės su sėjimo kultūra ir žinomos koncentracijos bandomąja medžiaga (nuo 10 iki 40 mg/l DOC), kuri nominaliai yra vienintelis organinės anglies šaltinis, tūris yra aeruojamas tamsoje arba išsklaidytoje šviesoje  $22 \pm 2$  °C temperatūroje.

Skaidymas sekamas, 28 paras trumpais intervalais atliekant DOC analizę. Biologinio skaidymo laipsnis skaičiuojamas pašalintos DOC koncentraciją (pataisyta dėl DOC koncentracijos sėjimo kultūros tuščiajame kontroliniame bandinyje) reiškiant pradinės koncentracijos procentine dalimi. Pradinio biologinio skaidymo laipsnį galima skaičiuoti pagal papildomą cheminę analizę, atliekamą inkubavimo pradžioje ir pabaigoje.

### II.2. BANDYMO METODO APRAŠYMAS

#### II.2.1. **Aparatūra**

- a) Kūginės kolbos, pvz., nuo 250 ml iki 2 litrų, tūris priklauso nuo DOC analizei reikalingo tūrio;
- b) purtyklė, skirta kūginėms kolboms dėti, arba su automatiniu termostatavimu arba naudojama patalpoje su pastovia temperatūra, ir pakankamo galingumo, kad visose kolbose galima būtų palaikyti aerobines sąlygas;
- c) filtravimo aparatas su tinkamomis membranomis;
- d) DOC analizatorius;
- e) ištirpusio deguonies nustatymo aparatūra;
- f) centrifuga.

#### II.2.2. **Mineralinės terpės ruošimas**

Apie pradinių tirpalų ruošimą, žr. I.6.2.

Sumaišykite 10 ml (a) tirpalo su 800 ml skiedimo vandens, įpilkite po 1 ml (b) – (d) tirpalų ir praskieskite skiedimo vandeniu iki 1 litro.

#### II.2.3. **Sėjimo kultūros ruošimas ir pradinis kondicionavimas**

Sėjimo kultūrą galima ruošti iš įvairių šaltinių: aktyvusis dumblas; nuotekų ištakiai; paviršiniai vandenys; dirvožemiai arba mišiniai iš šių šaltinių.

Žr. I.6.4, I.6.4.1, I.6.4.2 ir I.6.5.

#### II.2.4. **Kolbų ruošimas**

Pavyzdžiui, į atskiras 2 l kūgines kolbas įpilkite po 800 ml mineralinės terpės ir pakankamą tūrį bandomosios ir etaloninės medžiagos pradinių tirpalų, kad DOC koncentracija atitiktų 10–40 mg/l. Patikrinkite pH vertes ir prireikus nustatykite lygią 7,4. Įdėkite į kolbas sėjimo kultūros iš aktyviojo dumblo arba kito šaltinio (žr. I.6.4), kad galutinė suspenduotų kietųjų dalelių koncentracija būtų ne didesnė kaip 30 mg/l. Taip pat paruoškite sėjimo kultūros tirpalą mineralinėje terpėje kontrolinį bandinį, kuriame nebūtų bandomosios arba etaloninės medžiagos.

Jei reikia, vieną indą naudokite tikrinti galimą bandomosios medžiagos inhibuojamajam poveikiui, į panašios koncentracijos bandomosios ir etaloninės medžiagų tirpalą mineralinėje terpėje įdėję sėjimo kultūros.

Be to, jei reikia, paruoškite dar vieną sterilią kolbą su chemine medžiaga be sėjimo kultūros, kad galėtumėte nustatyti, ar vyksta bandomosios medžiagos abiotinis skaidymas (žr. I.6.6).

Papildomai, jei kyla įtarimas, kad bandomąją medžiagą labai adsorbuoja stiklas, dumblas ir t. t., atlikite parengiamąjį vertinimą galimą adsorbicijos laipsniui nustatyti ir, tuo pačiu, bandymo tinkamumui šiai cheminei medžiagai (žr. 1 lentelę). Paruoškite kolbą su bandomąja medžiaga, sėjimo kultūra ir sterilizavimo medžiaga.

Visus tirpalus kolbose skieskite mineraline terpe iki 1 l ir, išmaišę, iš kiekvienos kolbos paimkite bandinį DOC pradinei koncentracijai nustatyti (žr. 2.4 priedėlį). Uždenkite kolbų angas pvz., aliuminio folija taip, kad tarp kolbos ir ją supančios aplinkos laisvai judėtų oras. Tuomet bandymui pradėti įstatykite kolbas į purtyklę.

#### II.2.5. Kolbų skaičius tipiniame bandyme

1 ir 2 kolba: bandomoji suspensija

3 ir 4 kolba: sėjimo kultūros tuščiasis bandinys

5 kolba: metodikos tikrinimo bandinys

ir pageidautina bei kai būtina:

6 kolba: abiotinio skaidymo sterilus kontrolinis bandinys

7 kolba: adsorbicijos kontrolinis bandinys

8 kolba: toksiškumo kontrolinis bandinys

Žr. dar I.6.7.

#### II.2.6. Bandymo procedūra

Visą bandymo laiką žinomais laiko tarpais, bet pakankamai dažnai, kad galima būtų nustatyti 10 parų lango pradžią ir šalinimo procentinę vertę 10 parų lango pabaigoje, kiekvienoje kolboje po du kartus nustatykite DOC koncentraciją. Imkite tik mažiausią bandomosios suspensijos tūrį, reikalingą kiekvienam nustatymui.

Jei būtina, prieš imdami bandinį, kompensuokite garavimo iš kolbų nuostolius, įpildami reikiamą kiekį skiedimo vandens (I.6.1). Prieš imdami bandinį, gerai sumaišykite kultūros terpę ir užtikrinkite, kad prieš bandinio ėmimą ant kolbos sienelių prilipusi medžiaga būtų ištirpinta arba suspenduota. Paėmę bandinį, jį iš karto filtruokite per membranine filtrą arba centrifuguokite (žr. 2.4 priedėlį). Nufiltruotus arba centrifuguotus bandinius analizuokite tą pačią dieną arba laikykite 2–4 °C temperatūroje ne ilgiau kaip 48 h, jei ilgiau – žemesnėje kaip –18 °C temperatūroje.

#### II.3. DUOMENYS IR ATASKAITA

##### II.3.1. Rezultatų apdorojimas

Apskaičiuokite skaidymo procentinę vertę laiku t, kaip nurodyta I.7.1. (DOC nustatymas) ir, neprivalomai, kaip I.7.2. (specifinė analizė).

Visus rezultatus užrašykite pateiktose specifikacijose.



II.3.2. **Rezultatų tinkamumas**

Žr. I.5.2.

II.3.3. **Ataskaita**

Žr. I.8.

## II.4. SPECIFIKACIJA

Toliau pateiktas specifikacijos pavyzdys.

## DOC IŠNYKIMO BANDYMAS

1. **LABORATORIJA**2. **BANDYMO PRADŽIOS DATA**3. **BANDOMOJI MEDŽIAGA**

Pavadinimas:

Pradinio tirpalo koncentracija: ... mg/l, kaip cheminės medžiagos

Pradinė koncentracija terpėje,  $t_0$ : ... mg/l, kaip cheminės medžiagos4. **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 $C_{b(t)}$					

	Kolba Nr.		DOC (mg/l) po n parų				
			0	n <sub>1</sub>	n <sub>2</sub>	n <sub>3</sub>	n <sub>x</sub>
Sėjimo kultūros tuščiasis bandinys be bandomosios medžiagos	3	C <sub>1</sub>					
		C <sub>2</sub>					
		C, vidutinė vertė C <sub>c(t)</sub>					
	4	d <sub>1</sub>					
		d <sub>2</sub>					
		d, vidutinė vertė C <sub>d(t)</sub>					
			$C_{bl(t)} = \left( \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2} \right)$				

#### 6. NEAPDOROTŲ DUOMENŲ VERTINIMAS

Kolba Nr.		skaidymo % po n parų				
		0	n <sub>1</sub>	n <sub>2</sub>	n <sub>3</sub>	n <sub>x</sub>
1	$D_1 = \left( 1 - \left( \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_{a(o)} - C_{bl(o)}} \right) \right) \times 100$	0				
2	$D_2 = \left( 1 - \left( \frac{C_{b(t)} - C_{bl(t)}}{C_{b(o)} - C_{bl(o)}} \right) \right) \times 100$	0				
Vidutinė vertė (!)	$D = \left( \frac{D_1 + D_2}{2} \right)$	0				

(!) D<sub>1</sub> ir D<sub>2</sub> vidutinė vertė neturi būti skaičiuojama, jei tarp jų yra didelis skirtumas.

Pastaba. Panašūs formatai gali būti taikomi etaloninei medžiagai ir toksiškumo kontroliniams bandiniams.

#### 7. ABIOTINIO SKAIDYMO KONTROLINIS BANDINYS (neprivalomas)

	Laikas (paros)	
	0	t
DOC koncentracija (mg/l) steriliam kontroliniame bandinyje	C <sub>s(o)</sub>	C <sub>s(t)</sub>

$$\text{biotinio skaidymo \%} = \left( \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100 \right)$$

#### 8. SPECIFINĖ CHEMINĖ ANALIZĖ (neprivaloma)

	Bandomosios medžiagos likutinis kiekis bandymo pabaigoje (mg/l)	Pirminio skaidymo %
Sterilus kontrolinis bandinys	S <sub>b</sub>	

	Bandomosios medžiagos likutinis kiekis bandymo pabaigoje (mg/l)	Pirminio skaidymo %
Bandymo terpė su sėjimo kultūra	$s_a$	$\left( \frac{S_b - S_a}{S_b} \right) \times 100$

### III DALIS. MODIFIKUOTAS OECD ATRANKOS BANDYMAS (C.4-B metodas)

#### III.1. BANDYMO METODO PRINCIPAS

Į išmatuotą mineralinės terpės tūrį su žinoma koncentracija bandomosios medžiagos (nuo 10 iki 40 mg/l DOC), kuri nominaliai yra vienintelis organinės anglies šaltinis, įpilama sėjimo kultūros 0,5 ml vienam litrui terpės. Mišinys yra aeruojamas tamsioje arba išsklaidytoje šviesoje  $22 \pm 2$  °C temperatūroje.

Skaidymas sekamas, 28 paras trumpais intervalais atliekant DOC analizę. Biologinio skaidymo laipsnis skaičiuojamas pašalintos DOC koncentraciją (pataisyta dėl DOC koncentracijos sėjimo kultūros tuščiajame kontroliniame bandinyje) reiškiant pradinės koncentracijos procentine dalimi. Pradinio biologinio skaidymo laipsnį galima skaičiuoti pagal papildomą cheminę analizę, atliekamą inkubavimo pradžioje ir pabaigoje.

#### III.2. BANDYMO METODO APRAŠYMAS

##### III.2.1. Aparatūra

- 1) Kūginės kolbos, pvz., nuo 250 ml iki 2 litrų, tūris priklauso nuo DOC analizei reikalingo tūrio;
- 2) purtyklė, skirta kūginėms kolboms dėti, kuri būtų arba su automatinio termostavimu 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.

Mikroelementų tirpalas:

Mangano sulfatas, tetrahidratas, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$	39,9 mg
Boro rūgštis, $H_3BO_3$	57,2 mg
Cinko sulfatas, heptahidratas, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	42,8 mg
Amonio heptamolibdatas, $(NH_4)_6 MO_7 O_{24}$	34,7 mg
Fe-chelatas ( $FeCl_3$ ir etilendiamintetraacto rūgštis)	100,0 mg

Ištirpinkite skiedimo vandenį ir praskieskite juo iki 1 000 ml

Vitaminų tirpalas:

Mielių ekstraktas 15,0 mg

Ištirpinkite mielių ekstraktą 100 ml vandens. Sterilizuokite filtruodami per 0,2 µm membraną arba pagaminkite šviežiai.

### III.2.3. Sėjimo kultūros ruošimas ir pradinis kondicionavimas

Sėjimo kultūra 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 litrui mineralinės terpės.

### III.2.4. Kolbų ruošimas

Pavyzdžiui, į atskiras 2 l kūgines kolbas įpilkite po 800 ml mineralinės terpės ir pakankamą tūrį bandomosios ir etaloninės medžiagos pradinių tirpalų, kad DOC koncentracija atitiktų 10–40 mg/l. Patikrinkite pH vertę ir prireikus nustatykite lygį 7,4. Įdėkite į kolbas 0,5 ml/l sėjimo kultūros iš nuotekų ištakio (žr. I.6.4.2). Taip pat paruoškite sėjimo kultūros tirpalo mineralinėje terpėje kontrolinį bandinį, kuriame nebūtų bandomosios arba etaloninės medžiagos.

Jei reikia, vieną indą naudokite tikrinti galimam bandomosios medžiagos inhibuojamajam veikimui, į panašios koncentracijos bandomosios ir etaloninės medžiagų tirpalą mineralinėje terpėje įdėję sėjimo kultūros. Be to, jei reikia, paruoškite dar vieną sterilią kolbą su chemine medžiaga be sėjimo kultūros, kad galėtumėte nustatyti, arba vyksta bandomosios medžiagos abiotinis skaidymas (žr. I.6.6.).

Papildomai, jei kyla įtarimas, kad bandomąją medžiagą labai adsorbuoja stiklas, dumblas ir t. t., atlikite parengiamąjį vertinimą galimam adsorbcijos laipsniui nustatyti ir, tuo pačiu, bandymo tinkamumui šiai cheminei medžiagai (žr. 1 lentelę). Paruoškite kolbą su bandomąja medžiaga, sėjimo kultūra ir sterilizavimo medžiaga.

Visus tirpalus kolbose skieskite mineraline terpe iki 1 l ir, tirpalus išmaišę, iš kiekvienos kolbos paimkite bandinį DOC pradinei koncentracijai nustatyti (žr. 2.4 priedėlį). Uždenkite kolbų angas,

pvz., aliuminio folija taip, kad tarp kolbos ir ją supančios aplinkos laisvai judėtų oras. Tuomet bandymui pradėti įstatykite kolbas į purtyklę.

### III.2.5. Kolbų skaičius tipiniame bandyme

1 ir 2 kolba: bandomoji suspensija

3 ir 4 kolba: sėjimo kultūros tuščiasis bandinys

5 kolba: metodikos tikrinimo bandinys

ir pageidautina bei kai būtina:

6 kolba: abiotinio skaidymo sterilus kontrolinis bandinys

7 kolba: adsorbcijos kontrolinis bandinys

8 kolba: toksiškumo kontrolinis bandinys

Žr. dar I.6.7.

### III.2.6. Bandymo procedūra

Visą bandymą žinomais laiko intervalais, bet pakankamai dažnai, kad galima būtų nustatyti 10 parų lango pradžią ir procentinę šalinimo vertę 10 parų lango pabaigoje, nustatykite po du kartus DOC koncentracijas kiekvienoje kolboje. Imkite tik minimalų kiekvienam nustatymui reikalingą bandomosios suspensijos tūrį.

Jei būtina, prieš imdami bandinį kompensuokite garavimo iš kolbų nuostolius, įpildami reikiamą kiekį skiedimo vandens (I.6.1). Prieš imdami bandinį, gerai sumaišykite kultūros terpę ir užtikrinkite, kad prieš bandinio ėmimą ant kolbos sienelių prilipusi medžiaga būtų ištirpinta arba suspenduota. Paėmę bandinį, jį iš karto filtruokite per membranine filtrą arba centrifuguokite (žr. 2.4 priedėlį). Nufiltruotus arba centrifuguotus bandinius analizuokite tą pačią dieną arba laikykite 2–4 °C temperatūroje ne ilgiau kaip 48 h, jei ilgiau – žemesnėje kaip -18 °C temperatūroje.

### III.3. DUOMENYS IR ATASKAITA

#### III.3.1. Rezultatų apdorojimas

Apskaičiuokite skaidymo procentinę vertę laiku  $t$ , kaip nurodyta I.7.1. (DOC nustatymas) ir, neprivalomai, kaip I.7.2 (specifinė analizė).

Visus rezultatus užrašykite pateiktose specifikacijose.

#### III.3.2. Rezultatų tinkamumas

Žr. I.5.2.

#### III.3.3. Ataskaita

Žr. I.8.

### III.4. SPECIFIKACIJA

Toliau pateiktas specifikacijos pavyzdys.

#### MODIFIKUOTAS OECD ATRANKOS BANDYMAS

##### 1. LABORATORIJA

##### 2. BANDYMO PRADŽIOS DATA

##### 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 <sub>1</sub>	n <sub>2</sub>	n <sub>3</sub>	n <sub>x</sub>	
Bandomoji cheminė medžiaga ir sėjimo kultūra	1	a <sub>1</sub>						
		a <sub>2</sub>						
		a, vidutinė vertė C <sub>a(t)</sub>						
	2	b <sub>1</sub>						
		b <sub>2</sub>						
		b, vidutinė vertė C <sub>b(t)</sub>						
Sėjimo kultūros tuščiasis bandinys be bandomosios medžiagos	3	C <sub>1</sub>						
		C <sub>2</sub>						
		C, vidutinė vertė C <sub>c(t)</sub>						
	4	d <sub>1</sub>						
		d <sub>2</sub>						
		d, vidutinė vertė C <sub>d(t)</sub>						
			$C_{bl(t)} = \left( \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2} \right)$					

## 6. NEAPDOROTŲ DUOMENŲ VERTINIMAS

Kolba Nr.		Skaidymo % po n parų				
		0	n <sub>1</sub>	n <sub>2</sub>	n <sub>3</sub>	n <sub>x</sub>
1	$D_1 = \left( 1 - \left( \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_{a(o)} - C_{bl(o)}} \right) \right) \times 100$	0				
2	$D_2 = \left( 1 - \left( \frac{C_{b(t)} - C_{bl(t)}}{C_{b(o)} - C_{bl(o)}} \right) \right) \times 100$	0				
Vidutinė vertė (*)	$D = \left( \frac{D_1 - D_2}{2} \right)$	0				

(\*) D<sub>1</sub> ir D<sub>2</sub> vidutinė vertė neturi būti skaičiuojama, jei tarp jų yra didelis skirtumas.

Pastaba. Panašūs formatai gali būti taikomi etaloninei medžiagai ir toksiškumo kontroliniams bandiniams.

7. **ABIOTINIO SKAIDYMO KONTROLINIS BANDINYS** (neprivalomas)

	Laikas (paros)	
	0	t
DOC koncentracija (mg/l) steriliame kontroliniame bandyme	$C_{s(0)}$	$C_{s(t)}$

$$\text{abiotinio skaidymo \%} = \left( \frac{C_{s(0)} - C_{s(t)}}{C_{s(0)}} \times 100 \right)$$

8. **SPECIFINĖ CHEMINĖ ANALIZĖ** (neprivaloma)

	Bandomosios medžiagos likutis bandymo pabaigoje (mg/l)	Pirminis suirimas, %
Sterilus kontrolinis bandinys	$S_b$	
Bandymo terpė su sėjimo kultūra	$S_a$	$\left( \frac{S_b - S_a}{S_b} \right) \times 100$

IV DALIS. **CO<sub>2</sub> IŠSISKYRIMO BANDYMAS** (C.4-C metodas)

## IV.1. BANDYMO METODO PRINCIPAS

Išmatuotas mineralinės terpės su sėjimo kultūra tūris, kuriame kaip vienintelis nominalus organinės anglies šaltinis yra žinomos koncentracijos bandomoji cheminė medžiaga (10–20 mg DOC arba TOC/l), tamsoje arba išsklaidytoje šviesoje yra aeruojamas, reguliuojamu greičiu barbotuojant anglies dioksido neturintį orą. Skaidymas 28 paras stebimas, nustatant susidariusio anglies dioksido, sugeriamo bario arba natrio hidroksidu, kiekį, matuojamą likusio hidroksido titravimu arba kaip neorganinė anglis. Iš bandomosios cheminės medžiagos susidariusio anglies dioksido kiekis (pataisytas atsižvelgiant į anglies dioksido, susidarancio tuščiajame bandinyje su sėjimo kultūra, kiekį) yra skaičiuojamas kaip procentinė ThCO<sub>2</sub> vertė. Kitaip biologinio skaidymo laipsnį galima skaičiuoti atliekant papildomą DOC analizę inkubavimo laikotarpiu pradžioje ir pabaigoje.

## IV.2. BANDYMO METODO APRAŠYMAS

IV.2.1. **Aparatūra**

- 2–5 litrų talpos kolbos, kiekviena su aeravimo vamzdžiu, beveik siekiančiu indo dugną, ir išleidimo anga;
- magnetiniai maišikliai, kai vertinamos mažai tirpios cheminės medžiagos;
- dujų sugėrimo kolbos;
- įtaisas reguliuoti ir matuoti oro srautą;
- aparatas anglies dioksidui išplauti, kuriuo ruošiamas oras, neturintis anglies dioksido; pagal kitą būdą galima naudoti iš balionų tiekiamų CO<sub>2</sub> neturincio deguonies ir CO<sub>2</sub> neturincio azoto mišinį, dujas maišant teisingu santykiu (20 % O<sub>2</sub>: 80 % N<sub>2</sub>);
- įtaisas anglies dioksidui nustatyti titravimo būdu arba kokio nors tipo neorganinės anglies analizatorius;
- membraninio filtravimo įtaisas (neprivalomas);
- DOC analizatorius (neprivalomas).

**IV.2.2. Mineralinės terpės ruošimas**

Apie pradinių tirpalų ruošimą žr. I.6.2.

Sumaišykite 10 ml (a) tirpalo su 800 ml skiedimo vandens, įpilkite po 1 ml (b) – (d) tirpalų ir praskieskite skiedimo vandeniu iki 1 litro.

**IV.2.3. Sėjimo kultūros ruošimas ir pradinis kondicionavimas**

Sėjimo kultūrą galima ruošti iš įvairių šaltinių: aktyvusis dumblas; nuotekų ištakiai; paviršiniai vandenys; dirvožemiai arba mišiniai iš šių šaltinių.

Žr. I.6.4, I.6.4.1, I.6.4.2 ir I.6.5.

**IV.2.4. Kolbų ruošimas**

Kaip pavyzdys, toliau nurodyti tūriai ir masės 5 litrų kolboms su 3 l suspensijos. Jei naudojate mažesnius tūrius, kiekius atitinkamai keiskite, tačiau užtikrinkite, kad būtų galima tiksliai matuoti susidariusio anglies dioksido kiekį.

Į kiekvieną 5 litrų kolbą įpilkite 2 400 ml mineralinės terpės. Įpilkite atitinkamą tūrį paruošto aktyviojo dumбло (žr. I.6.4.1 ir I.6.5), kad suspenduotų kietųjų dalelių koncentracija mišinio su sėjimo kultūra galutiniame 3 l tūryje būtų ne didesnė kaip 30 mg/l. Kitas būdas, kai paruoštas dumblas iš pradžių skiedžiamas mineralinėje terpėje ruošiant 500–1 000 mg/l suspensiją, po to alikvotinis šios suspensijos tūris pilamas į 5 litrų kolbos turinį, kad koncentracija būtų 30 mg/l; tai užtikrina didesnę preciziškumą. Galima naudoti kitus sėjimo kultūros šaltinius (žr. I.6.4.2).

Per naktį šiuos mišinius su sėjimo kultūra aeruokite CO<sub>2</sub> neturinciu oru, kad iš sistemos būtų išvalytas anglies dioksidas.

Į lygiagrečiam bandymui skirtas kolbas atskirai įpilkite bandomosios ir etaloninės medžiagų žinomus pradinių tirpalų tūrius, kad dėl įdėtų cheminių medžiagų būtų gautos nuo 10 iki 20 mg DOC arba TOC/l koncentracijos; į kai kurias kolbas cheminių medžiagų nedėkite, bet palikite jas kaip sėjimo kultūros kontrolinius bandinius. Mažai tirpias medžiagas dėkite tiesiai į kolbas, remdamiesi mase arba tūriu, arba darykite, kaip aprašyta 3 priedėlyje.

Jei reikia, vieną kolbą naudokite bandomosios cheminės medžiagos galimam inhibuojamajam veikimui tikrinti, įdėdami į ją ir bandomosios, ir etaloninės cheminės medžiagos, kurių koncentracija būtų tokia pat, kaip ir kitose kolbose.

Be to, jei reikia patikrinti, arba nevyksta bandomosios cheminės medžiagos abiotinis skaidymas, turėkite sterilią kolbą su bandomąja chemine medžiaga be sėjimo kultūros (žr. I.6.6). Sterilizuokite įdėdami atitinkamos koncentracijos nuodingos medžiagos.

Suspensijas visose kolbose skieskite iki 3 litrų, įpildami mineralinės terpės, prieš tai aeruojamos CO<sub>2</sub> neturinciu oru. Neprivaloma, bet galima siurbti bandinius DOC analizei (žr. 2.4 priedėlį) ir (arba) specifinei analizei. Prie kolbų oro išleidimo angų prijunkite dujų sugėrimo kolbas.

Jei naudojamas bario hidroksidas, prie kiekvienos 5 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, jun-kite dvi gaudyklės, iš kurių antroji būtų kontrolinė, siekiant įrodyti, kad visas anglies dioksidas buvo absorbuotas pirmoje gaudyklėje. Tinka dujų sugėrimo kolbos, uždarytos serumo butelių dangčiais. Į kiekvieną kolbą įpilkite 200 ml 0,05 M natrio hidroksido tirpalo, kurio pakanka sugerti visą kiekį anglies dioksido, išsiskyrusio visiškai suskaidant bandomąją medžiagą. Natrio hidroksido tirpalas, net šviežiai paruoštas, turi karbonatų pėdsakus; pataisa padaroma atimant tuščiajame bandinyje susidariusio karbonato kiekį.

**IV.2.5. Kolbų skaičius tipiniame bandyme**

1 ir 2 kolba: bandomoji suspensija

3 ir 4 kolba: sėjimo kultūros tuščiasis bandinys



5 kolba: metodikos tikrinimo bandinys

ir pageidautina bei kai būtina:

6 kolba: abiotinio skaidymo sterilus kontrolinis bandinys

7 kolba: toksiškumo kontrolinis bandinys

Žr. dar I.6.7.

#### IV.2.6. Bandymo procedūra

Pradėkite bandymą, per suspensijas barbotuodami 30–100 ml/min oro be CO<sub>2</sub> srautą. CO<sub>2</sub> nustatyti periodiškai imkite anglies dioksido absorbento bandinius. Norint identifikuoti 10 parų lango periodą, rekomenduojama pirmąsias dešimt dienų analizę atlikti kas antrą arba kas trečią dieną, o po to iki 28 paros – kas penktą dieną.

28 parą paimkite bandinius (neprivalomai) DOC ir (arba) specifinei analizei, išmatuokite suspensijų pH vertes ir į kiekvieną kolbą įpilkite 1 ml koncentruotos druskos rūgšties; aeruokite kolbas per naktį, kad iš bandomųjų suspensijų būtų pašalintas anglies dioksidas. 29 parą atlikite paskutinę išsiskyrusio anglies dioksido analizę.

CO<sub>2</sub> matavimo dieną atjunkite arčiausiai kolbos prijungtą absorberį su bario hidroksidu, ir titruokite bario hidroksido tirpalą 0,05 M HCl tirpalu, indikatoriumi naudodami fenoltaleiną. Perkelkite likusius absorberius per vieną vietą arčiau kolbos ir kitame nuosekliai sujungtų absorberių gale prijunkite naują absorberį su 100 ml šviežio 0,0125 M bario hidroksido. Titruokite, kai tai būtina, pvz., kai pirmojoje gaudyklėje matyti daug nuosėdų, bet jų dar nėra antroje, arba bent kartą per savaitę. Kitu atveju, jei absorberiu naudojamas NaOH, švirktu iš arčiau kolbos stovinčio absorberio paimkite mažą natrio hidroksido tirpalo bandinį (tai priklauso nuo naudojamo anglies analizatoriaus charakteristikų). Purškite bandinį į anglies analizatoriaus IC dalį, kad galėtumėte tiesiogiai nustatyti išsiskyrusį anglies dioksidą.

Antrosios gaudyklės turinį analizuokite tik bandymo pabaigoje, kad būtų galima padaryti pataisą dėl galimo anglies dioksido išnešimo.

#### IV.3. DUOMENYS IR ATASKAITA

##### IV.3.1. Rezultatų apdorojimas

Absorberyje titruojant sugerto CO<sub>2</sub> kiekis nustatomas pagal tokią formulę:

$$\text{mg CO}_2 = (100 \times C_B - 0,5 \times V \times C_A) \times 44$$

čia:

V = 100 ml absorberio turinio titruoti sunaudotos HCl tūris (ml)

C<sub>B</sub> = bario hidroksido tirpalo koncentracija (M)

C<sub>A</sub> = druskos rūgšties tirpalo koncentracija (M)

jei C<sub>B</sub> lygi 0,0125 M ir C<sub>A</sub> lygi 0,05 M, 100 ml bario hidroksido tirpalui titruoti reikia 50 ml, ir CO<sub>2</sub> masė nustatoma pagal lygtį:

$$\left( \frac{0,05}{2} \right) \times (44 \times \text{ml HCl sunaudoto titravimui}) = 1,1 \times \text{ml HCl}$$

Taigi šiuo atveju titravimui sunaudoto HCl tūrio perskaičiavimo į susidariusio CO<sub>2</sub> mg faktorius yra 1,1.

Naudodami atitinkamas titravimo vertes, apskaičiuokite vien iš sėjimo kultūros bei iš sėjimo kultūros ir bandomosios cheminės medžiagos gauto CO<sub>2</sub> mases, ir šių masių skirtumas yra masė CO<sub>2</sub>, 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,

$$\text{CO}_2 \text{ iš sėjimo kultūros} = 1,1 \times (50 - 48) = 2,2 \text{ mg}$$

$$\text{CO}_2 \text{ iš sėjimo kultūros ir bandomosios cheminės medžiagos} = 1,1 \times (50 - 45) = 5,5 \text{ mg}$$

taigi, iš bandomosios cheminės medžiagos susidariusio CO<sub>2</sub> masė lygi 3,3 mg.

Procentinė biologinio skaidymo vertė skaičiuojama pagal formulę:

$$\text{Skaidymo \%} = \left( \frac{(\text{mg CO}_2 \text{ išsiskyrusio} \times 100)}{(\text{ThCO}_2 \times \text{mg pridėtos bandomosios cheminės medžiagos})} \right)$$

arba,

$$\text{skaidymo \%} = \left( \frac{(\text{mg CO}_2 \text{ išsiskyrusio} \times 100)}{(\text{pridėtosbandyme TOC kiekis(mg)} \times 3,67)} \right)$$

3,67 yra anglies masės perskaičiavimo į anglies dioksido masę (44/12) faktorius.

Skaidymo po bet kurio laiko intervalo procentinę vertę gaukite pridėdami procentines ThCO<sub>2</sub> vertes, apskaičiuotas kiekvienai parai, iki to laiko, kuriuo jis buvo išmatuotas.

Absorberiams su natrio hidroksidu susidariusio anglies dioksido kiekį, išreikštą IC (mg), skaičiuokite daugindami IC koncentraciją absorbente iš absorbento tūrio.

Procentinę skaidymo vertę skaičiuokite pagal:

$$\% \text{ of ThCO}_2 = \left( \frac{(\text{IC kolboje subandomą medžiaga(mg)} - \text{IC kolboje sutuščiuojubandiniu(mg)})}{(\text{TOC, pridėtos kaip bandomoji medžiaga, masė(mg)})} \right) \times 100$$

Apskaičiuokite DOC šalinimą (neprivaloma), kaip aprašyta I.7. Užrašykite šiuos ir visus kitus rezultatus pridėtoje specifikacijoje.

#### 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<sub>2</sub> kiekis paprastai neturi būti didesnis kaip 40 mg/l terpės. Jei gaunamos didesnės kaip 70 mg CO<sub>2</sub>/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

Pradinė koncentracija terpėje: ... mg/l, kaip cheminės medžiagos

Bendras į kolbą įdėtos C kiekis: ... mg C

ThCO<sub>2</sub>: mg CO<sub>2</sub>4. **SĖJIMO KULTŪRA**

Šaltinis:

Kaip apdorota:

Pradinis kondicionavimas, jei toks buvo:

Suspenduotų kietųjų dalelių koncentracija reakcijos mišinyje: mg/l

5. **ANGLIES DIOKSIDO SUSIDARYMAS IR SKAIDUMAS**Metodas: Ba(OH)<sub>2</sub>/NaOH/kitas

Laikas (paros)	Bandinyje susidaręs CO <sub>2</sub> (mg)		Tuščiajame bandinyje susidaręs CO <sub>2</sub> (mg)		Bendras susidaręs CO <sub>2</sub> (mg) (bandinio vidutinė vertė atėmus tuščiojo bandinio vidutinę vertę)		bendras $\left(\frac{\text{ThCO}_2}{(\text{ThCO}_2)}\right) \times 100$		
	1 2	vidutinė vertė	3 4	vidutinė vertė	1	2	1	2	vidutinė vertė
0									
n <sub>1</sub>									
n <sub>2</sub>									
n <sub>3</sub>									
28									

Pastaba. Panašūs formatai gali būti taikomi etaloninei medžiagai ir toksiškumo kontroliniams bandiniams.

6. **ANGLIES ANALIZĖ (neprivaloma)**

Anglies analizatorius:

Laikas (paros)	Tuščiasis bandinys, mg/l	Bandomoji cheminė medžiaga, mg/l
0	C <sub>b(0)</sub>	C <sub>0</sub>
28 (*ac)	C <sub>b(t)</sub>	C <sub>t</sub>

(\*) Arba inkubavimo pabaigoje

$$\text{pašalintos DOC \%} = \left( 1 - \frac{(C_t - C_{b(t)})}{(C_t - C_{b(o)})} \right) \times 100$$

7. **ABIOTINIS SKAIDYMAS** (neprivalomas)

$$\text{abiotinio skaidymo \%} = \left( \frac{(\text{CO}_2 \text{ susidaręs CO sterilioje kolboje po 28 parų})}{(\text{ThCO}_2 (\text{mg}))} \right) \times 100$$

V DALIS. **MANOMETRINIS RESPIROMETRINIS BANDYMAS** (C.4-D metodas)

V.1. **BANDYMO METODO PRINCIPAS**

Išmatuotas mineralinės terpės su sėjimo kultūra tūris, turintis žinomos koncentracijos bandomąją cheminę medžiagą (100 mg/litre bandomosios medžiagos, duodančios bent 50–100 mg ThOD/l), kuri nominaliai yra vienintelis organinės anglies šaltinis, pastovioje temperatūroje ( $\pm 1$  °C arba tiksliau) maišomas uždaroje kolboje iki 28 parų. Deguonies suvartojimas nustatomas arba matuojant deguonies (elektrolitiškai pagaminto) kiekį, kurio reikia pastoviam dujų tūriui respirometro kolboje palaikyti, arba pagal tūrio arba slėgio (arba abiejų kartu) kitimą aparate. Išsiskyręs anglies dioksidas sugeriamas kalio hidroksido tirpalu arba kitu tinkamu absorbentu. Bandomosios cheminės medžiagos suvartoto deguonies kiekis (pataisytas atsižvelgiant į deguonies, suvartoto lygiagrečiai atliekamame tuščiajame bandyme su sėjimo kultūra, kiekį) yra reiškiamas procentine ThOD arba COD verte. Neprivalomai, iš papildomos specifinės analizės, atliekamos inkubavimo pradžioje ir pabaigoje, duomenų galima apskaičiuoti pirminį biologinį skaidymą, o atliekant DOC analizę – biologinį suskaidymą.

V.2. **BANDYMO METODO APRAŠYMAS**

V.2.1. **Aparatūra**

- a) tinkamas respirometras;
- b) termostatas, palaikantis temperatūrą  $\pm 1$  °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 skieddami pradinius tirpalus, ruoškite atskiras serijas bandomosios ir etaloninės cheminių medžiagų tirpalų, kuriuose cheminės medžiagos koncentracija paprastai būtų 100 mg/litre (gauti ThOD bent 50–100 mg/l).

ThOD skaičiuokite pagal amonio druskų susidarymą, jei nesitikite nitrifikavimo, kai skaičiuoti reikia pagal nitratų susidarymą (žr. 2.2 priedėlį).

Nustatykite pH vertes ir prireikus nustatykite  $7,4 \pm 0,2$ .

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 3 priedėlyje. Į CO<sub>2</sub> absorberio sekcijas įpilkite kalio hidroksido, natrio kalkių granulių arba kito absorbento.

#### V.2.5. Kolbų skaičius tipiniame bandyme

1 ir 2 kolba: bandomoji suspensija

3 ir 4 kolba: sėjimo kultūros tuščiasis bandinys

5 kolba: metodikos tikrinimo bandinys

ir pageidautina bei kai būtina:

6 kolba: sterilus kontrolinis bandinys

7 kolba: toksiškumo kontrolinis bandinys

Žr. dar I.6.7.

#### V.2.6. Bandymo procedūra

Leiskite kolboms pasiekti tinkamą temperatūrą ir į atitinkamas kolbas įdėkite tiek sėjimo kultūros iš paruošto aktyviojo dumblo arba kitokio jos šaltinio, kad suspenduotų kietųjų dalelių koncentracija būtų ne didesnė kaip 30 mg/litre. Surinkite įrangą, įjunkite purtyklę, patikrinkite hermetiškumą ir pradėkite matuoti deguonies suvartojimą. Paprastai toliau prižiūrėti nereikia, išskyrus tai, kad reikia užrašyti būtinus rodmenis ir atlikti kasdienius tikrinimus norint įsitikinti, kad palaikoma teisinga temperatūra ir tinkamas maišymas.

Pagal dažnai ir reguliariais intervalais užrašomus rodmenis skaičiuokite deguonies suvartojimą, taikydami įrangos gamintojo nurodytus metodus. Inkubavimo pabaigoje, paprastai po 28 parų, matuokite kolbų turinio pH, ypač jei deguonies suvartojimas yra mažas arba didesnis nei ThOD<sub>NH4</sub> (azoto turintiems junginiams).

Jei reikia, bandymo pradžioje ir pabaigoje iš respirometrinių kolbų paimkite bandinius DOC analizei arba specifinei cheminei analizei (žr. 2.4 priedėlį). Imdami bandymo pradžioje užtikrinkite, kad kolboje likusios bandomosios suspensijos tūris būtų žinomas. Kai deguonį vartoja azoto turinti bandomoji medžiaga, nustatykite nitrito ir nitrato koncentracijos didėjimą per 28 paras ir apskaičiuokite pataisą dėl deguonies, suvartoto nitrifikavimui (5 priedėlis).

#### V.3. DUOMENYS IR ATASKAITA

##### V.3.1. Rezultatų apdorojimas

Padalinkite kiekį (mg) deguonies, suvartoto bandomosios cheminės medžiagos per tam tikrą laiką (pataisytą atsižvelgiant į deguonies, suvartoto per tą patį laiką tuščiajame sėjimo kultūros kontroliniame bandinyje, kiekį) iš paimtos bandomosios cheminės medžiagos masės. Taip gausite BOD, skaičiuojamą mg deguonies/mg bandomosios cheminės medžiagos, taigi:

$$\text{BOD} = \frac{(\text{O}_2 \text{ suvartojimas bandomąja chemine medžiaga} - (\text{mg}) \text{O}_2 \text{ suvartojimas tu ščiagame bandinyje (mg)})}{(\text{bandomosios medžiagos kolboje (mg)})}$$

= mg O<sub>2</sub> vienam mg bandomosios cheminės medžiagos

biologinio skaidymo procentinę vertę skaičiuokite pagal:

$$\text{biologinio skaidymo \%} = \% \text{ ThOD} = \left( \frac{(\text{BOD (mg O}_2\text{/mg cheminės medžiagos)})}{(\text{ThOD (mg O}_2\text{ cheminei medžiagai)})} \right) \times 100$$

arba pagal:

$$\% \text{ COD} = \left( \frac{(\text{BOD (mg O}_2\text{/mg cheminės medžiagos)})}{(\text{COD (mg O}_2\text{ cheminės medžiagos)})} \right) \times 100$$

Reikia pažymėti, kad šie du metodai nebūtinai duoda tą pačią vertę; geriau naudoti pirmesnį metodą.

Azoto turinčioms bandomosioms medžiagoms naudokite atitinkamas ThOD vertes (NH<sub>4</sub> arba NO<sub>3</sub>) pagal tai, kas yra žinoma apie nitrifikavimo galimybę arba ko iš jo laukiama (2.2 priedėlis). Jei nitrifikavimas vyksta, tačiau ne iki galo, pataisais nitrifikuoti suvartotam deguoniui skaičiuokite pagal nitrito ir nitrato koncentracijų pokyčius (5 priedėlis).

Kai atliekama neprivaloma organinės anglies ir (arba) specifinė analizė, apskaičiuokite skaidymo procentinę vertę, kaip tai aprašyta I.7.

Visus rezultatus užrašykite į pridedamas specifikacijas.

### V.3.2. **Rezultatų tinkamumas**

Paprastai deguonies suvartojimas sėjimo kultūros tuščiajame bandinyje per 28 paras yra 20–30 mg O<sub>2</sub>/l ir neturi būti didesnis kaip 60 mg/l. Jei vertės didesnės kaip 60 mg/l, būtina kritiškai ištirti duomenis ir eksperimento metodikas. Jei pH vertė nepatenka į 6–8,5 intervalą, o bandomoji medžiaga deguonies suvartoja mažiau kaip 60 %, bandymas turi būti pakartotas su mažesne bandomosios cheminės medžiagos koncentracija.

Žr. dar I.5.2.

### V.3.3. **Ataskaita**

Žr. I.8.

## V.4. **SPECIFIKACIJA**

Toliau pateiktas specifikacijos pavyzdys.

### MANOMETRINĖS RESPIROMETRIJOS BANDYMAS

1. **LABORATORIJA**
2. **BANDYMO PRADŽIOS DATA**
3. **BANDOMOJI MEDŽIAGA**

Pavadinimas:

Pradinio tirpalo koncentracija: ... mg/l

Pradinė koncentracija terpėje,  $C_0$ : ... mg/l

Tūris bandymo kolboje (V): ... ml

ThOD arba COD: ... mg O<sub>2</sub>/mg bandomosios medžiagos (NH<sub>4</sub> arba NO<sub>3</sub>)

#### 4. SĖJIMO KULTŪRA

Šaltinis:

Kaip apdorota:

Pradinis kondicionavimas, jei toks buvo:

Suspenduotų kietųjų dalelių koncentracija reakcijos mišinyje: ... mg/l

#### 5. DEGUONIES SUVARTOJIMAS. BIOLOGINIS SKAIDUMAS

		Laikas (paros)											
		0	7	14	21	28							
O <sub>2</sub> suvartojimas. (mg) bandomoji cheminė medžiaga	1												
	2												
	a, vidutinė vertė												
O <sub>2</sub> suvartojimas (mg) tuščiasis ban- dinys	3												
	4												
	b, vidutinė vertė												
Pataisyta BOD vertė (mg)	(a <sub>1</sub> - b <sub>m</sub> )												
	(a <sub>2</sub> - b <sub>m</sub> )												
BOD vienam mg bandomosios che- minės medžiagos	$\frac{(a_1 - b)}{(C_0 V)}$												
	$\frac{(a_2 - b)}{(C_0 V)}$												
Skaidymo % $\left(\frac{(\text{BOD})}{(\text{ThOD})}\right) \times 100$	D <sub>1</sub> (a <sub>1</sub> )												
	D <sub>2</sub> (a <sub>2</sub> )												
	vidutinė vertė (*bd)												

V = terpės tūris bandymo kolboje

(\*) D<sub>1</sub> ir D<sub>2</sub> vidutinė vertė neturi būti skaičiuojama, jei tarp verčių yra didelis skirtumas.

Pastaba. Panašūs formatai gali būti taikomi etaloninei medžiagai ir toksiškumo kontroliniams bandiniams.

6. **PATAISA DĖL NITRIFIKAVIMO** (žr. 5 priedėlį)

Para	0	28	Skirtumas
i) Nitrato koncentracija (mg N/l)	—	—	(N)
ii) Deguonies ekvivalentas ( $4,57 \times N \times V$ ) (mg)	—	—	(N)
iii) Nitrito koncentracija (mg N/l)	—	—	
iv) Deguonies ekvivalentas ( $3,43 \times N \times V$ ) (mg)	—	—	
ii + iv) Bendrasis deguonies ekvivalentas	—	—	

7. **ANGLIES ANALIZĖ** (neprivaloma)

Anglies analizatorius:

Laikas (paros)	Tuščiasis bandinys, mg/l	Bandomoji cheminė medžiaga, mg/l
0	$C_{b(o)}$	$C_o$
28 (°c)	$C_{b(t)}$	$C_t$

(°) Arba inkubavimo pabaigoje.

$$\text{DOC pašalinimas \%} = \left( 1 - \left( \frac{C_t - C_{bt}}{C_o - C_{bo}} \right) \right) \times 100$$

8. **SPECIFINĖ CHEMINĖ ANALIZĖ** (neprivaloma)

$S_b$  = koncentracija fizikocheminių procesų (steriliume) kontroliniame bandinyje po 28 parų

$S_a$  = koncentracija kolboje su sėjimo kultūra po 28 parų.

$$\text{biologinio skaidymo \%} = \left( \frac{S_b - S_a}{S_b} \right) \times 100$$

9. **ABIOTINIS SKAIDYMAS** (neprivalomas)

a = deguonies suvartojimas steriliose kolbose po 28 parų (mg)

$$\text{deguonies suvartojimas mg bandomosios cheminės medžiagos} = \frac{(a \times 100)}{(C_o V)}$$

(žr. 1 ir 3 skirsnius)

$$\text{abiotinio skaidymo \%} = \frac{(a \times 100)}{(C_o V \times \text{ThOD})}$$

VI DALIS. **UŽDAROSIOS KOLBOS BANDYMAS** (C.4-E metodas)

## VI.1 BANDYMO METODO PRINCIPAS

Į bandomosios cheminės medžiagos tirpalą mineralinėje terpėje, paprastai 2–5 mg/l, dedama sėjimo kultūra, turinti palyginti mažai mikroorganizmų iš mišrios populiacijos, ir tirpalas laikomas tamsoje visiškai pilnose ir uždarytose kolbose pastovios temperatūros sąlygomis. Skaidymas sekamas 28 paras analizuojant ištirpusią deguonį. Bandomosios medžiagos suvartotas deguonies kiekis, pakoregavus atsižvelgiant į deguonies, suvartoto lygiagrečiai atliekamame tuščiajame bandyme su sėjimo kultūra, kiekį, yra išreikiamas procentine ThOD arba COD verte.



**VI.2. METODO APRAŠYMAS****VI.2.1. Aparatūra**

- a) BOD kolbos su šlifo kamščiais, pvz., 250–300 ml;
- b) vandens vonia arba inkubatorius kolboms laikyti pastovioje temperatūroje ( $\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  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 litruvi terpės naudokite nuo vieno lašo (0,05 ml) iki 5 ml filtrato; gali tekti atlikti bandymus, kad galėtumėte nustatyti tam tikram ištakiui optimalų tūrį (žr. I.6.4.2 ir I.6.5).

**VI.2.4. Kolbų ruošimas**

Stipriai aeruokite mineralinę terpę bent 20 min. Atlikite kiekvieną bandymų grupę su mineraline terpe, gauta vienos partijos. Dažniausiai terpė yra tinkama naudoti po 20 h laikymo bandymo temperatūroje. Kontrolės tikslams nustatykite ištirpusio deguonies koncentraciją; jos vertė  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$  temperatūroje turi būti apie 9 mg/l. Visus oru prisotintos terpės pernešimo ir užpildymo veiksmus atlikite neleisdami susidaryti oro burbuliukams, pvz., naudodami sifonus.

Paruoškite lygiagrečias BOD kolbų grupes bandomajai ir etaloninei cheminei medžiagai nustatyti tuo pat metu daromų eksperimentų serijose. Surinkite pakankamą skaičių BOD kolbų, įskaitant kolbas tuščiajam bandiniui su sėjimo kultūra, kad galėtumėte daryti bent po du deguonies suvartojimo matavimus norimais laiko tarpais, pvz., po 0, 7, 14, 21 ir 28 parų. Norint užtikrinti galimybę identifikuoti 10 parų langą, kolbų gali reikėti daugiau.

Į dideles kolbas įpilkite visiškai aeruotos mineralinės terpės, kad ji užimtų maždaug trečdalį kolbos tūrio. Tuomet į atskiras dideles kolbas įpilkite pakankamą kiekį bandomosios ir etaloninės cheminių medžiagų pradinių tirpalų taip, kad galutinė cheminių medžiagų koncentracija paprastai būtų ne didesnė kaip 10 mg/litre. Į vieną didelę kolbą su tuščiojo kontrolinio bandinio terpe cheminių medžiagų nedėkite.

Norint užtikrinti, kad sėjimo kultūros aktyvumas nebūtų ribojamas, ištirpusio deguonies koncentracija BOD kolbose neturi sumažėti daugiau kaip iki 0,5 mg/litre. Tai nustato maždaug 2 mg/litre ribą tiriamosios cheminės medžiagos koncentracijai. Tačiau sunkiai skaidomų junginių ir tų junginių, kurių ThOD mažas, koncentracija gali būti 5–10 mg/l. Kai kuriais atvejais būtų patartina atlikti lygiagrečias bandymų serijas su dviem bandomosios cheminės medžiagos koncentracijomis, pvz., 2 ir 5 mg/l. Paprastai ThOD skaičiuokite pagal amonio druskų susidarymą, tačiau, jei manoma arba žinoma, kad gali vykti nitrifikavimas, skaičiuokite remdamiesi nitrato susidarymu (ThOD<sub>NO<sub>3</sub></sub>; žr. 2.2 priedėlį). Jei nitrifikavimas vyksta, tačiau ne iki galo, pataisas nitrifikuoti suvartotam deguoniui skaičiuokite pagal nitrito ir nitrato koncentracijų pokyčius (žr. 5 priedėlį).

Jei turi būti ištirtas bandomosios medžiagos toksiškumas (pvz., jei anksčiau buvo nustatytos mažos biologinio skaidumo vertės), reikia turėti dar vieną kolbų seriją.

Paruoškite dar vieną didelę kolbą, kurioje būtų aeruota mineralinė terpė (maždaug trečdalis kolbos tūrio) ir bandomoji bei etaloninė cheminės medžiagos, kurių galutinė koncentracija būtų tokia pati, kaip ir kitose didelėse kolbose.

Į tirpalus didelėse kolbose įpilkite sėjimo kultūros iš antrinio ištakio (nuo vieno lašo arba apie 0,05 ml iki 5 ml/l) arba iš kito šaltinio, pvz., upės vandens (žr. I.6.4.2). Pabaigoje tirpalus skieskite aeruota mineraline terpe iki žymės ant kolbos, naudodami į jos dugną nuleistą žarną, kad būtų atitinkamas maišymas.

#### VI.2.5. Kolbų skaičius tipiniame bandyme

Tipiniame bandyme naudojamos tokios kolbos:

- bent 10 su bandomąja chemine medžiaga ir sėjimo kultūra (bandomoji suspensija),
- bent 10 tik su sėjimo kultūra (tuščiasis sėjimo kultūros bandinys),
- bent 10 su etalonine chemine medžiaga ir sėjimo kultūra (metodikos tikrinimo bandinys),
- ir, kai būtina, 6 kolbos su bandomąja chemine medžiaga, etalonine chemine medžiaga ir sėjimo kultūra (toksiškumo kontrolinis bandinys). Tačiau, norint užtikrinti galimybę identifikuoti 10 parų langą, kolbų reikėtų maždaug du kartus daugiau.

#### VI.2.6. Bandymo procedūra

Naudodami žarną, nuleistą į apatinį atitinkamos didelės kolbos ketvirtį (ne į dugną), iš karto išpilstykite kiekvieną paruoštą tirpalą į atitinkamą BOD kolbų grupę taip, kad visos BOD kolbos būtų visiškai užpildytos. Švelniai patapšnokite kolbas, kad būtų pašalinti visi oro burbuliukai. Neatidėliojant nustatykite pradinę ištirpusio deguonies koncentraciją kolbose, taikydami Winklerio arba elektrodo metodą. Kolbų turinį galite išsaugoti vėlesnei analizei Winklerio metodu, pridėdami mangano (II) sulfato ir natrio hidroksido (pirmasis Winklerio reagentas). Gerai užkimštas kolbas su deguonimi, surištu į rudą mangano (III) hidratuotą oksidą, laikykite tamsoje 10–20 °C temperatūroje ne ilgiau kaip 24 valandas prieš atlikdami likusius veiksmus pagal Winklerio metodą. Likusias lygiagrečiai paruoštas kolbas užkimškite taip, kad į jas nepatektų oro burbuliukų, ir inkubuokite tamsoje 20 °C temperatūroje. Kiekvieną seriją turi lydėti pilna lygiagreti serija, skirta tuščiojo bandinio terpės su sėjimo kultūra analizei. Paimkite iš kiekvienos serijos bent po dvi kolbas ištirpusio deguonies analizei tam tikrais laiko tarpais (bent kas savaitę) per 28 inkubavimo paras.

Savaitiniai bandiniai turi leisti įvertinti šalinimo procentinę vertę 14 parų lange, tuo tarpu bandinių analizė kas 3–4 paras turi leisti identifikuoti 10 parų langą, o tam reikėtų maždaug du kartus daugiau kolbų.

Azoto turinčioms bandomosioms medžiagoms turi būti daroma pataisa dėl deguonies suvartojimo bet kokiame nitrifikavimo procese. Tam padaryti taikykite O<sub>2</sub>-elektrodo metodą ištirpusio deguonies koncentracijai nustatyti, o po to iš BOD kolbos paimkite bandinį nitrito ir nitrato analizei. Pagal nitrito ir nitrato koncentracijos padidėjimą apskaičiuokite suvartotą deguonį (žr. 5 priedėlį).

### VI.3. DUOMENYS IR ATASKAITA

#### VI.3.1. Rezultatų apdorojimas

Iš pradžių apskaičiuokite BOD, kuris pasireiškia per kiekvieną laiko periodą, atimdami deguonies suvartojimo tuščiajame bandinyje vertę (mg O<sub>2</sub>/litre) iš deguonies suvartojimo bandomąja medžiaga. Gauti savitajai BOD vertei, skaičiuojamai mg deguonies vienam mg bandomosios cheminės medžiagos, šią pataisytą suvartojimo vertę dalinkite iš bandomosios medžiagos koncentracijos (mg/litre). Biologinio skaidumo procentinę vertę skaičiuokite dalindami savitąjį BOD iš savitojo ThOD (apskaičiuoto pagal 2.2 priedėlį) arba COD (nustatyto analizės būdu, žr. 2.3 priedėlį), taigi:

$$\text{BOD} = \left( \frac{\text{O}_2 \text{ suvartojimas bandomąja chemine medžiaga (mg)} - \text{O}_2 \text{ suvartojimas tuščiajame bandinyje (mg)}}{\text{bandomosios medžiagos kiekis kolboje (mg)}} \right) = \text{kiekis O}_2 \text{ (mg) vienam mg bandomosios cheminės medžiagos}$$

$$\text{Skaidymo \%} = \left( \frac{\text{BOD (mg O}_2 \text{/mg bandomosios cheminės medžiagos)}}{\text{ThOD (mg O}_2 \text{/mg bandomosios cheminės medžiagos)}} \right) \times 100$$

Arba

$$\text{Skaidymo \%} = \left( \frac{(\text{BOD (mgO}_2\text{/mg bandomosios cheminės medžiagos)})}{(\text{COD (mgO}_2\text{/mg bandomosios cheminės medžiagos)})} \right) \times 100$$

Reikia pažymėti, kad šie du metodai nebūtinai duoda tą pačią vertę; geriau naudoti pirmesnį metodą.

Azoto turinčioms medžiagoms naudokite atitinkamas ThOD vertes (NH<sub>4</sub> arba NO<sub>3</sub>) pagal tai, kas yra žinoma apie nitrifikavimo galimybę arba ko iš jo laukiama (2.2 priedėlis). Jei nitrifikavimas vyksta, tačiau ne iki galo, pataisas nitrifikuoti suvartotam deguoniui skaičiuokite pagal nitrito ir nitrato koncentracijų pokyčius (5 priedėlis).

### VI.3.2. Rezultatų tinkamumas

Deguonies suvartojimas tuščiajame bandinyje su sėjimo kultūra po 28 parų turi būti ne didesnis kaip 1,5 mg/litre ištirpusio deguonies. Jei vertės didesnės, reikia tikrinti eksperimento metodikas. Likutinė deguonies koncentracija bet kuriuo momentu bandymo kolbose neturi sumažėti daugiau kaip iki 0,5 mg/litre. Tokių mažų deguonies lygių nustatymas yra tinkamas tik tokiu atveju, jei ištirpusio deguonies nustatymo metodu įmanoma tiksliai juos matuoti.

Žr. dar I.5.2.

### VI.3.3. Ataskaita

Žr. I.8.

### VI.4. SPECIFIKACIJA

Toliau pateiktas specifikacijos pavyzdys.

#### UŽDAROSIOS KOLBOS BANDYMAS

1. **LABORATORIJA**
2. **BANDYMO PRADŽIOS DATA**
3. **BANDOMOJI MEDŽIAGA**

Pavadinimas:

Pradinio tirpalo koncentracija: ... mg/litre

Pradinė koncentracija kolboje: ... mg/litre

ThOD arba COD: ... mg O<sub>2</sub>/mg bandomosios medžiagos

4. **SĖJIMO KULTŪRA**

Šaltinis:

Kaip apdorota:

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 <sub>1</sub>	n <sub>2</sub>	
Tuščiasis bandinys (be cheminės medžiagos)	1	C <sub>1</sub>				
	2	C <sub>2</sub>				
Vidutinė vertė	$m_b = \frac{(C_1 + C_2)}{(2)}$					
Bandomoji cheminė medžiaga	1	a <sub>1</sub>				
	2	a <sub>2</sub>				
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 priedėlių)

Inkubavimo trukmė (paros)	0	n <sub>1</sub>	n <sub>2</sub>	n <sub>3</sub>
i) Nitrato koncentracija (mg N/litre)	—			
ii) Nitrato koncentracijos pokytis (mg N/litre)	—			
iii) Deguonies ekvivalentas (mg/litre)				
iv) Nitrito koncentracija (mg N/litre)	—			
v) Nitrito koncentracijos pokytis (mg N/litre)	—			
vi) Deguonies ekvivalentas (mg/litre)	—			
iii + vi) Bendrasis deguonies ekvivalentas (mg/litre)				

## 7. DO SUVARTOJIMAS. SKAIDYMO %

	Suvartota per n parų (mg/litre)			
	n <sub>1</sub>	n <sub>2</sub>	n <sub>3</sub>	
KOLBA 1: (m <sub>to</sub> - m <sub>tx</sub> ) - (m <sub>bo</sub> - m <sub>bx</sub> )				
KOLBA 2: (m <sub>to</sub> - m <sub>tx</sub> ) - (m <sub>bo</sub> - m <sub>bx</sub> )				
KOLBA 1: $D_1\% = \frac{((m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})) \times 100}{(\text{bandymo koncentracija} \times \text{cheminės medžiagos ThOD})}$				
KOLBA 2: $D_2\% = \frac{((m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})) \times 100}{(\text{bandymo koncentracija} \times \text{cheminės medžiagos} \times \text{ThOD})}$				
D % vidutinė vertė (*) = $\frac{(D_1 - D_2)}{(2)}$				

(\*) Jei tarp lygiagrečių nustatymų yra didelis skirtumas, vidutinės vertės neskaiciuokite.

- $m_{t_0}$  = vertė bandymo kolboje laiku 0  
 $m_{t_x}$  = vertė bandymo kolboje laiku x  
 $m_{b_0}$  = tuščiojo bandinio vidutinė vertė laiku 0  
 $m_{b_x}$  = tuščiojo bandinio vidutinė vertė laiku x

Taip pat darykite pataisą dėl nitrifikavimo, naudodami 6 skyriaus iii + vi.

## 8. DO SUVARTOJIMAS TUŠČIAJAME BANDINYJE

Deguoies suvartojimas tuščiajame bandinyje:  $(m_{b_0} - m_{b_{28}})$  mg/litre. Šis suvartojimas svarbus bandymo tinkamumui. Suvartojimas turi būti mažesnis kaip 1,5 mg/litre.

### VII DALIS. M.I.T.I. BANDYMAS (C.4-F metodas)

#### VII.1. BANDYMO METODO PRINCIPAS

Deguoies suvartojimas maišomu bandomosios medžiagos tirpalu arba suspensija mineralinėje terpėje, į kurią dedama specialiai auginama neadaptuotų mikroorganizmų kultūra, 28 paras automatiškai matuojamas tamsoje ir  $25 \pm 1$  °C temperatūroje laikomame uždareme respirometre. Išsiskyęs anglies dioksidas absorbuojamas natrio kalcėmis. Biologinis skaidumas reiškiamas deguoies suvartojimo (pataisyto atsižvelgiant į suvartojimą tuščiajame bandinyje) procentine teorinio suvartojimo (ThOD) dalimi. Be to, pirminio biologinio skaidumo procentinė vertė skaičiuojama pagal papildomos specifinės cheminės analizės, atliekamos inkubavimo pradžioje ir pabaigoje, duomenis ir, neprivalomai, pagal DOC analizės duomenis.

#### VII.2. BANDYMO METODO APRAŠYMAS

##### VII.2.1. Aparatūra

- Automatinis elektrolitinis BOD matuoklis arba respirometras, paprastai su 6 kolbomis, kurių kiekvienos tūris 300 ml, ir su indu CO<sub>2</sub> absorbentui laikyti;
- patalpa su pastovia temperatūra ir (arba) vandens vonia 25 °C ± 1 °C arba geriau;
- membraninio filtravimo įtaisas (neprivalomas);
- 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 <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                                     | 8,50 g  |
|    | Kalio hidrofosfatas, K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                                       | 21,75 g |
|    | Natrio hidrofosfatas, dodekahidratas, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 12 H <sub>2</sub> O | 44,60 g |
|    | Amonio chloridas, NH <sub>4</sub> Cl   | 1,70 g  |
|    | Ištirpinkite vandenyje ir praskieskite iki 1 litro   |         |
|    | Tirpalo pH turi būti 7,2   |         |
| b) | Magnio sulfatas, heptahidratas, MgSO <sub>4</sub> 7 H <sub>2</sub> O                       | 22,50 g |
|    | Ištirpinkite vandenyje ir praskieskite iki 1 litro   |         |
| c) | Kalcio chloridas, bevandenis, CaCl <sub>2</sub>  | 27,50 g |
|    | Ištirpinkite vandenyje ir praskieskite iki 1 litro   |         |
| d) | Geležies (III) chloridas, heksahidratas, FeCl <sub>3</sub> 6 H <sub>2</sub> 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 įvairios cheminės medžiagos naudojamos ir šalinamos. Iš tokių vietų kaip, pvz., nuotekų valymo įrenginių, pramoninių nuotekų valymo įrenginių, upių, ežerų, jūrų, surinkite 1 l dumblo, paviršiaus dirvožemio, vandens ir t. t. bandinių ir gerai juos kartu sumaišykite. Pašalinkite paviršiuje plaukiojančias medžiagas ir palikite nusistovėti, po to natrio hidrokksidu arba fosforo rūgštimi nustatykite skysčio virš nuosėdų pH vertę  $7 \pm 1$ .

Atitinkamą filtruoto skysčio virš nuosėdų tūrį naudokite užpildyti aktyviojo dumblo užpildymo ir išleidimo (*fill-and-draw*) indą ir aeruokite skystį maždaug 231/2 h. Trisdešimt minučių po aeravimo pabaigos maždaug trečdali viso skysčio virš nuosėdų išpilkite ir ant nusodintos medžiagos užpilkite tokį pat tūrį tirpalo (pH 7), kuriame būtų po 0,1 % gliukozės, peptono ir kalio dihidrofosfato, ir vėl aeruokite. Kartokite šią procedūrą kartą per dieną. Dumblo įrenginys turi būti eksploatuojamas laikantis geros praktikos: ištakiai turi būti skaidrūs, turi būti palaikoma  $25 \pm 2$  °C temperatūra, pH turi būti  $7 \pm 1$ , dumblas turi gerai nusistovėti, turi būti pakankamas aeravimas, kad mišinys visą laiką būtų aerobinis, turi būti paprasčiausių vienaląsčių organizmų ir dumblo aktyvumas turi būti tikrinamas pagal etaloninę medžiagą bent kas tris mėnesius. Dumblo kaip sėjimo kultūros nenaudokite anksčiau kaip po mėnesio nuo proceso pradžios, bet ne vėliau kaip po keturių mėnesių. Po to, imkite bandinius bent iš 10 vietų reguliariais laiko tarpais, kartą per tris mėnesius.

Norint, kad senojo ir naujojo dumblo aktyvumas būtų toks pat, sumaišykite vienodus tūrius filtruoto skysčio virš naudojamo aktyviojo dumblo ir filtruoto skysčio virš šviežiai surinkto dešimties šaltinių mišinio ir auginkite mikroorganizmus supiltuose skysčiuose, kaip tai aprašyta aukščiau. Imkite dumblą naudoti kaip sėjimo kultūrą 18–24 h po to, kai įrenginys buvo įkrautas.

### VII.2.4. Kolbų ruošimas

Paruoškite tokias šešias kolbas:

Nr. 1: bandomosios cheminės medžiagos tirpalas skiedimo vandenyje, 100 mg/l

Nr. 2, 3 ir 4: bandomosios cheminės medžiagos tirpalas mineralinėje terpėje, 100 mg/l

Nr. 5: etaloninės cheminės medžiagos (pvz., anilino) tirpalas mineralinėje terpėje, 100 mg/l

Nr. 6: tik mineralinė terpė

Mažai tirpias medžiagas dėkite tiesiai pagal masę arba pagal tūrį arba apdorokite, kaip aprašyta 3 priedėlyje, išskyrus tai, kad neturi būti naudojami nei tirpikliai, nei emulsikliai. Į visas kolbas specialiuose induose įdėkite CO<sub>2</sub> absorbento. Kolbose Nr. 2, 3 ir 4 nustatykite pH vertę 7,0.

### VII.2.5. Bandymo procedūra

Į kolbas Nr. 2, 3 ir 4 (bandomosios suspensijos), Nr. 5 (aktyvumo kontrolinis bandinys) ir Nr. 6 (tuščiasis bandinys su sėjimo kultūra) įpilkite mažą tūrį sėjimo kultūros, kad suspenduotų kietųjų dalelių koncentracija būtų 30 mg/l. Sėjimo kultūros nedėkite į kolbą Nr. 1, kurioje yra abiotinio skaidymo kontrolinis bandinys. Surinkite įrangą, patikrinkite hermetiškumą, įjunkite purtykles ir pradėkite matuoti deguonies suvartojimą tamsoje. Kasdien tikrinkite temperatūrą, purtyklę ir kulonometrinių deguonies suvartojimo registravimo įrenginį bei stebėkite bet kokius kolbų turinio spalvos kitimus. Deguonies suvartojimo rodmenis šešiose kolbose registruokite tiesiogiai tinkamu metodu, pvz., šešių taškų savirašiu, brėžiančiu BOD kreivę. Inkubavimo pabaigoje, kuris paprastai tęsiasi 28 paras, išmatuokite kolbų turinio pH ir nustatykite likusios bandomosios medžiagos ir kiekvieno tarpinio produkto koncentraciją, ir, vandenyje tirpios medžiagos atveju, DOC koncentraciją (2.4 priedėlis). Imkitės ypatingų priemonių lakiųjų cheminių medžiagų atveju. Jei tikėtės, kad gali vykti nitrifikavimas, nustatykite nitrito ir nitrato koncentraciją, jei tai įmanoma.

## VII.3. DUOMENYS IR ATASKAITA

### VII.3.1. Rezultatų apdorojimas

Padalinkite kiekį (mg) deguonies, bandomosios cheminės medžiagos suvartoto per tam tikrą laiką ir pataisytą atsižvelgiant į deguonies, suvartoto per tą patį laiką tuščiajame sėjimo kultūros bandinyje, kiekį, iš naudojamos bandomosios cheminės medžiagos masės. Taip gaunamas BOD, skaičiuojamas mg deguonies/mg bandomosios medžiagos, taigi:

$$\text{BOD} = \frac{\left( (\text{O}_2 \text{ suvartojimas bandomąja chemine medžiaga (mg)} - \text{mgO}_2 \text{ suvartojimas tuščiajame bandinyje (mg)}) \right)}{\text{(bandomosios medžiagos kiekis kolboje (mg))}}$$

= kiekis O<sub>2</sub> (mg) vienam mg bandomosios cheminės medžiagos

Tuomet biologinio skaidymo procentinė vertė gaunama pagal lygtį:

$$\text{Skaidymo \%} = \% \text{ThOD} = \left( \frac{\text{BOD (mg O}_2\text{/mg cheminės medžiagos)}}{\text{(ThOD (mg O}_2\text{/mg cheminės medžiagos))}} \right) \times 100$$

Mišinių ThOD skaičiuokite pagal elementinę analizę, kaip paprasto junginio. Naudokite atitinkamas ThOD (ThOD<sub>NH4</sub> arba ThOD<sub>NO3</sub>) vertes pagal tai, ar nitrifikavimas nevyksta, ar jis yra visiškas (2.2 priedėlis). Jei nitrifikavimas vyksta, tačiau ne iki galo, pataisas nitrifikuoti suvartotam deguoniui skaičiuokite pagal nitrito ir nitrato koncentracijų pokyčius (5 priedėlis).

Pirminio biologinio skaidymo procentinę vertę skaičiuokite pagal specifinės (pradinės) cheminės medžiagos kiekio mažėjimą (žr. I.7.2).

$$D_t = \left( \frac{S_b - S_a}{S_b} \right) \times 100 \%$$

Nurodykite ataskaitoje, jei sumažėjo bandomosios medžiagos koncentracija kolboje Nr. 1, kurioje matuojamas fizikocheminis pašalinimas, o bandomosios cheminės medžiagos koncentraciją (S<sub>b</sub>), šioje kolboje po 28 parų naudokite apskaičiuoti biologinio skaidymo procentinei vertei.

Kai daromi DOC nustatymai (neprivalomi), apskaičiuokite biologinio suskaidymo procentinę vertę pagal:

$$D_t = \left( 1 - \frac{(C_t - C_{bt})}{(C_o - C_{bo})} \right) \times 100 \%$$

kaip aprašyta I.7.1. punkte. Jei DOC kiekis sumažėjo kolboje Nr. 1, DOC koncentraciją šioje kolboje naudokite apskaičiuoti biologinio skaidymo procentinei vertei.

Visus rezultatus užrašykite pateiktose specifikacijose.

### VII.3.2. **Rezultatų tinkamumas**

Paprastai deguonies suvartojimas sėjimo kultūros tuščiajame bandinyje per 28 paras yra 20–30 mg O<sub>2</sub>/litre ir neturi būti didesnis kaip 60 mg/litre. Jei vertės didesnės kaip 60 mg/litre, būtina kritiškai ištirti duomenis ir eksperimento metodikas. Jei pH vertė nepatenka į 6–8,5 intervalą, o bandomoji medžiaga deguonies suvartoja mažiau kaip 60 %, bandymas turi būti pakartotas su mažesne bandomosios cheminės medžiagos koncentracija.

Žr. dar I.5.2.

Jei anilino skaidymo procentinė vertė, apskaičiuota pagal deguonies suvartojimą, po 7 parų ne didesnė kaip 40 % ir po 14 parų ne didesnė kaip 65 %, laikoma, kad bandymas netinkamas.

### VII.3.3. **Ataskaita**

Žr. I.8.

### VII.4. SPECIFIKACIJA

Toliau pateiktas specifikacijos pavyzdys.

MITI (I) BANDYMAS

#### 1. LABORATORIJA

#### 2. BANDYMO PRADŽIOS DATA

3. **BANDOMOJI MEDŽIAGA**

Pavadinimas:

Pradinio tirpalo koncentracija: ... mg/l kaip cheminės medžiagos

Pradinė koncentracija terpėje,  $C_0$ : ... mg/l kaip cheminės medžiagos

Reakcijos mišinio tūris,  $V$ : ... ml

ThOD: ... mg  $O_2$ /l

4. **SĖJIMO KULTŪRA**

Dumblo bandinių ėmimo vietas:

- |        |         |
|--------|---------|
| 1) ... | 6) ...  |
| 2) ... | 7) ...  |
| 3) ... | 8) ...  |
| 4) ... | 9) ...  |
| 5) ... | 10) ... |

Suspenduotų kietųjų dalelių koncentracija aktyviajame dumble po aklimatizavimo sintetinėmis nuotekomis =... mg/l

Aktyviojo dumblo tūris vienam litrui galutinai paruoštos terpės =... ml

Dumblo koncentracija galutinai paruoštoje terpėje =... mg/l

5. **DEGUONIES SUVARTOJIMAS. BIOLOGINIS SKAIDUMAS**

Naudoto respirometro tipas:

		Laikas (paros)				
		0	7	14	21	28
Bandomosios medžiagos suvartojamo $O_2$ kiekis (mg)	$a_1$					
	$a_2$					
	$a_3$					
$O_2$ suvartojimas (mg) tuščiajame bandyme	$b$					
Pataisyta $O_2$ suvartojimo vertė (mg)	$(a_1 - b_1)$					
	$(a_2 - b_1)$					
	$(a_3 - b_1)$					
BOD vienam mg bandomosios cheminės medžiagos	$(a - b)$	1 Kolba				
	$(C_0 V)$	2 Kolba				
		3 Kolba				



			Laikas (paros)				
			0	7	14	21	28
Skaidymo % $\left(\frac{\text{BOD}}{\text{ThOD}}\right) \times 100$		1					
		2					
		3					
		vidutinė vertė (*)					

(\*) Vidutinių verčių neskaiciuokite, jei tarp lygiagrečių nustatymų yra didelis skirtumas.

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 <sub>1</sub>		b <sub>1</sub> -c			
Dumblas + bandomoji medžiaga	b <sub>2</sub>		b <sub>2</sub> -c			
Dumblas + bandomoji medžiaga	b <sub>3</sub>		b <sub>3</sub> -c			
Kontrolinis tuščias bandinys	c		—		—	—

$$\text{Pašalintos DOC\%: } \left(\frac{a_1 - (b - c)}{a}\right) \times 100$$

#### 7. SPECIFINĖS CHEMINĖS ANALIZĖS DUOMENYS

	Likutinis bandomosios medžiagos kiekis bandymo pabaigoje	Skaidymas %
Tuščias bandinys su vandeniu	S <sub>b</sub>	
Terpė su sėjimo kultūra	S <sub>a1</sub>	
	S <sub>a2</sub>	
	S <sub>a3</sub>	

$$\text{Skaidymo \%} = \left(\frac{S_b - S_a}{S_b}\right) \times 100$$

Apskaiciuokite skaidymo % atitinkamai kolbose a<sub>1</sub>, a<sub>2</sub> ir a<sub>3</sub>.

#### 8. PASTABA

Turi būti pridedama BOD kitimo laike kreivė, jei yra.

## 1 priedėlis

## SANTRUMPOS IR APIBRĖŽTYS

- DO : Ištirpęs deguonis (mg/l) yra vandeniniame bandinyje ištirpusio deguonies koncentracija.
- BOD : Biocheminis deguonies suvartojimas (g) yra deguonies kiekis, kurį suvartoja mikroorganizmai, įsisavindami bandomąją medžiagą; taip pat skaičiuojamas g suvartoto deguonies g bandomosios medžiagos (žr. C.5 metodą).
- COD : Cheminis deguonies suvartojimas (g) yra deguonies kiekis, suvartotas bandomąją medžiagą oksiduojant karštu, rūgščiu dichromato tirpalu; COD yra turimo oksiduojamos medžiagos kiekio matas; taip pat skaičiuojamas g deguonies, suvartoto g bandomosios medžiagos (žr. C.6 metodą).
- DOC : Ištirpusi organinė anglis yra organinė anglis tirpale arba organinė anglis, kuri praeina per 0,45 µm filtrą arba lieka skystyje virš nuosėdų po 15 min centrifugavimo 40 000 m.s<sup>-2</sup> (apie 4 000 g pagreičiu).
- ThOD : Teorinis deguonies suvartojimas (mg) yra bendras deguonies kiekis, kurio reikia visiškai oksiduoti cheminę medžiagą; jis skaičiuojamas pagal molekulinę formulę (žr. 2.2 priedėlį), dar kitaip skaičiuojamas mg deguonies, suvartojamo oksiduoti 1 mg bandomosios medžiagos.
- ThCO<sub>2</sub> : Teorinis anglies dioksido kiekis (mg) yra apskaičiuotas anglies dioksido, kuris susidaro iš žinomo arba išmatuoto anglies kiekio bandomojoje medžiagoje, kai ji visiškai mineralizuojama, kiekis; taip pat skaičiuojamas mg anglies dioksido, kuris susidaro iš 1 mg bandomosios medžiagos.
- TOC : Bendroji bandinio organinė anglis yra ištirpusios ir suspenduotos organinės anglies bendras kiekis.
- IC : Neorganinė anglis
- TC : Bendroji anglis yra bandinio organinės ir neorganinės anglies bendras kiekis.

*Pirminis biologinis skaidymas*

Biologiškai veikiamos medžiagos cheminės sandaros pokytis, kai ji netenka tai medžiagai būdingų savybių.

*Biologinis suskaidymas (aerobinis):*

Pasiektas skaidymo lygis, kai mikroorganizmai bandomąją medžiagą visiškai suvartoja ir susidaro anglies dioksidas, vanduo, mineralinės druskos ir naujos mikrobiologinės ląstelinės sudedamosios dalys (biomasė).

*Lengvai biologiškai skaidomas*

Cheminių medžiagų, su kuriomis buvo atliekami kai kurie apibrėžti atrankos pagal biologinį suskaidymą bandymai, sutartinis klasifikavimas; šie bandymai yra tokie tikslūs, kad laikoma, kad vandens terpėse aerobinėmis sąlygomis tokie junginiai greitai ir visiškai biologiškai suyra.

*Natūraliai biologiškai skaidomas*

Cheminių medžiagų, apie kurių biologinį skaidymą (pirminį arba suskaidymą) bet kokiame pripažintame biologinio skaidymo bandyme yra neabejotinų duomenų, klasifikavimas.

*Apdorojamumas*

Galimybė medžiagas paversti šalinamais junginiais biologinio nuotekų valymo metu, neigiamai neveikiant normalios valymo procesų eigos. Dažniausiai tinkamos apdoroti yra lengvai biologiškai skaidomos medžiagos, bet ne visi natūraliai biologiškai skaidomi junginiai. Gali vykti ir abiotiniai procesai.

*Vėlavimo trukmė*

Laikas nuo sėjimo kultūros įdėjimo DOC išnykimo bandyme iki kol skaidymo procentinė vertė pasiekia bent 10 %. Vėlavimo trukmė dažnai yra labai kintamas dydis ir jo atkuriamumas blogas.

*Skaidymo trukmė*

Laikas nuo vėlavimo laikotarpio pabaigos iki to laiko, kai skaidymas pasiekia 90 % didžiausios skaidymo vertės lygio.

*10 parų langas*

10 parų iš karto po to, kai skaidymo vertė pasiekė 10 %.

---

## 2 priedėlis

ATTINKAMŲ BENDRUJŲ PARAMETRŲ SKAIČIAVIMAS IR  
NUSTATYMAS

Nuo pasirinkto metodo priklauso, kokie bus reikalingi bendrieji parametrai. Šiame skyriuje aprašomas šių dydžių išvedimas. Šių parametrų taikymas aprašomas skyriuose apie atskirus metodus.

1. **Anglies kiekis**

Anglies kiekis skaičiuojamas pagal žinomą cheminę sudėtį arba nustatomas bandomosios medžiagos elementinė analizė.

2. **Teorinis deguonies suvartojimas (ThOD)**

Teorinis deguonies suvartojimas (ThOD) gali būti apskaičiuotas, jei žinoma elementinė sudėtis, arba jis gali būti nustatytas atliekant elementinę analizę. Junginio:



jei nitrifikavimas nevyksta,

$$ThOD_{NH_4} = \left( \frac{16 [2c + 1/2(h - cl - 3n) + 3s + 5/2p + 1/2na - o]}{(MW)} \right) \text{ mg/mg}$$

kai nitrifikavimas vyksta

$$ThOD_{NO_3} = \left( \frac{16 [2c + 1/2(h - cl) + 5/2n + 3s + 5/2p + 1/2na - o]}{(MW)} \right) \text{ mg/mg}$$

3. **Cheminis deguonies suvartojimas (COD)**

Cheminis deguonies suvartojimas (COD) nustatomas pagal C.6 metodą.

4. **Ištirpusi organinė anglis (DOC)**

Ištirpusi organinė anglis (DOC) pagal apibrėžtį yra bet kurios cheminės medžiagos arba medžiagų mišinio vandenyje organinė anglis, praeinanti per 0,45 µm filtrą.

Bandiniai iš bandymo indų siurbiami ir iš karto filtruojami filtravimo įtaisais, naudojant atitinkamą membraninį filtrą. Pirmieji 20 ml (kiekis gali būti mažesnis, kai naudojami maži filtrai) filtrato išpilami. 10–20 ml tūrio arba mažesni bandiniai, jei jie įpurškiami (tūris priklauso nuo anglies analizatoriui reikalingo tūrio), paliekami anglies kiekiui analizuoti. DOC koncentracija nustatoma organinės anglies analizatoriumi, kuriuo galima tiksliai nustatyti anglies koncentraciją, atitinkančią 10 % arba mažesnę nei 10 % bandyme naudotos pradinės DOC koncentracijos.

Filtruotus bandinius, kurių negalima analizuoti tą pačią darbo dieną, 48 h galima laikyti šaldytuve 2–4 °C temperatūroje, arba žemesnėje nei –18 °C, jei laikoma ilgiau.

*Pastabos*

Membraniniai filtrai, kad būtų hidrofiliški, dažnai impregnuojami paviršinio aktyvumo medžiagomis. Todėl filtrai gali būti iki kelių mg ištirpusios organinės anglies, kuri trukdytų biologinio skaidumo nustatymams. Paviršinio aktyvumo medžiagos ir kitos tirpios organinės medžiagos iš filtrų šalinamos juos virinant tris kartus po vieną valandą dejonizuotame vandenyje. Toliau filtrai gali būti savaitę laikomi vandenyje. Jei naudojamos vienkartinės filtravimo tūtos, kiekviena partija turi būti patikrinta, norint įsitikinti, kad nesusidaro ištirpusi organinė anglis.

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  $40\,000\text{ m. sec}^{-2}$  (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), Nonnenausschuß 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 SKAIDUMO VERTINIMAS**

Mažai tirpių medžiagų biologinio skaidumo bandymuose ypatingas dėmesys turi būti kreipiamas į toliau nurodytus aspektus.

Jei homogeniniai skysčiai retai kelia bandinio ėmimo problemų, tai kietąsias medžiagas rekomenduojama homogenizuoti tinkamu būdu, kad būtų išvengta paklaidų dėl nehomogeniškumo. Reikalingos specialios atsargumo priemonės, kai reikia paimti kelių miligramų reprezentatyvius cheminių medžiagų mišinių arba daug priemaišų turinčių medžiagų bandinius.

Bandymuose galima taikyti įvairius maišymo būdus. Reikia stengtis užtikrinti tik tokį maišymą, kad medžiaga būtų disperguotoje būsenoje, ir vengti perkaitinimo, per didelio putojimo ir per didelių slyties jėgų.

Galima naudoti emulsiklį, su kuriuo gaunama patvari cheminės medžiagos dispersija. Jis neturi būti nuodingas bakterijoms ir neturi būti biologiškai skaidomas arba bandymo sąlygomis putoti.

Emulsikliams taikomi kriterijai tinka ir tirpikliams.

Kietosioms bandomosioms medžiagoms nerekomenduojama naudoti kietuosius nešiklius, tačiau jie gali tikti aliejingoms medžiagoms.

Kai naudojamos pagalbinės medžiagos, pvz., emulsikliai, tirpikliai ir nešikliai, turi būti bandomas tuščiasis bandinys, kuriame būtų pagalbinė medžiaga.

Bet kuris iš trijų respirometrinių bandymų, CO<sub>2</sub>, BOD, MITI, gali būti taikomas mažai tirpių junginių biologiniam skaidumui tirti.

**NUORODOS**

- de Morsier, A. et al., Biodegradation tests for poorly soluble compounds. *Chemosphere*, 1987, vol. 16, p. 833.
- Gerike, P., The Biodegradability testing of poorly water-soluble compounds. *Chemosphere*. 1984, vol. 13, p. 169.

## 4 priedėlis

**CHEMINIŲ MEDŽIAGŲ, KURIOS GALI BŪTI NUODINGOS SĖJIMO KULTŪRAI, BIOLOGINIO SKAIDUMO VERTINIMAS**

Kai tiriant cheminę medžiagą lengvo biologinio skaidumo bandymuose paaiškėja, kad ji biologiškai neskaidoma, tai, jei norima atskirti, ar tai inhibuojamasis veikimas ar medžiagos inertiškumas, rekomenduojama tokia procedūra (Reynolds *et al.*, 1987).

Toksiškumo ir biologinio skaidumo bandymuose turi būti naudojama panaši arba identiška sėjimo kultūra.

Norint įvertinti cheminių medžiagų, tiriamų lengvo biologinio skaidumo bandymuose, toksiškumą, tiktų, kaip manoma, atskirai arba kartu taikyti dumblo kvėpavimo intensyvumo inhibavimo (aktyviojo dumblo kvėpavimo inhibavimo bandymas – Direktyva 88/302/EEB), BOD ir (arba) augimo inhibavimo metodus.

Manoma, kad, jei reikia išvengti inhibavimo dėl medžiagos toksiškumo, bandomųjų medžiagų, naudojamų lengvo biologinio skaidumo bandymuose, koncentracija turėtų būti mažesnė nei 1/10  $EC_{50}$  vertės (arba mažesnė nei  $EC_{20}$  vertė), gautos toksiškumo bandymuose. Nepanašu, kad junginiai, kurių  $EC_{50}$  vertė yra didesnė kaip 300 mg/l, būtų toksiški biologinio skaidumo bandymuose.

Mažesnės kaip 20 mg/l  $EC_{50}$  vertės greičiausiai turėtų kelti problemų toliau atliekamiems bandymams. Turi būti naudojamos mažos bandomosios koncentracijos, todėl reikia taikyti tikslų ir jautrų uždarnosios kolbos metodą arba naudoti  $^{14}C$  žymėtas medžiagas. Kitaip dar būtų galima naudoti aklimatizuotą sėjimo kultūrą, kuri, galbūt, leistų naudoti bandomąją medžiagą didesnėmis koncentracijomis. Tačiau šiuo atveju prarandamas specifinis lengvo biologinio skaidumo bandymo kriterijus.

## NUORODOS

Reynolds, L. et al.. Evaluation of the toxicity of substances to be assessed for biodegradability. Chemosphere, 1987, vol. 16, p. 225.

## 5 priedėlis

**DEGUONIES SUVARTOJIMO PATAISA DĖL NITRIFIKAVIMO KELIAMŲ TRUKDŽIŲ**

Jei nekreipiama dėmesio į nitrifikavimą, kai biologinis skaidumas vertinamas pagal bandomųjų medžiagų suvartojamo deguonies kiekį, tai paklaidos medžiagoms, kuriose nėra azoto, yra nežymios (ne didesnės kaip 5 %), net jei terpės amonio azoto oksidavimas bandomojo ir tuščiojo bandinio induose vyksta nevienodai. Tačiau, jei bandomosios medžiagos turi azoto, paklaidos gali būti didelės.

Jei nitrifikavimas įvyko, tačiau nevisiškai, stebimas reakcijos mišinio suvartojamo deguonies kiekis gali būti pakoreguotas atsižvelgiant į deguonies kiekį, suvartotą amonio jonui oksiduoti į nitritą ir nitratą, jei nitrito ir nitrato koncentracijų pokytis inkubavimo metu nustatomas atsižvelgiant į tokias reakcijų lygtis:



Suminė reakcija:



Pagal 1) lygtį, 28 g azoto, kuris yra amonio chloride ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ), oksiduoti į nitritą, reikia 96 g deguonies, t. y. faktorius lygus 3,43 (96/28). Tokiu pat būdu pagal 3) lygtį 28 g azoto, kai jis oksiduojamas į nitratą, suvartoja 128 g deguonies, t. y. faktorius lygus 4,57 (128/28).

Kadangi reakcijos yra nuoseklios ir vyksta dėl tam tikrų ir skirtingų bakterijų rūšių veiklos, įmanomas dalykas, kad nitrito koncentracija gali tiek didėti, tiek ir mažėti; pastaruoju atveju susidarytų ekvivalentiškas kiekis nitrato. Taigi, deguonies, suvartoto nitrato 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.:

$$\text{O}_2, \text{ suvartotas nitrato susidaryti} = 4,57 \times \text{nitrato koncentracijos padidėjimo} \quad (4)$$

Ir

$$\text{O}_2, \text{ suvartotas nitritui susidaryti} = 3,43 \times \text{nitrato koncentracijos padidėjimo} \quad (5)$$

Ir

$$\text{O}_2 \text{ netenkama dėl nitrito išnykimo} = - 3,43 \times \text{nitrato koncentracijos sumažėjimo} \quad (6)$$

Taigi

$$\text{O}_2 \text{ suvartojimas dėl nitrifikavimo} = \pm 3,43 \times \text{nitrato konc. pokyčio.} + 4,57 \times \text{nitrato konc. padidėjimo} \quad (7)$$

Ir todėl

$$\text{O}_2, \text{ suvartotas C oksiduoti} = \text{bendrasis stebėtas suvartotas kiekis} - \text{nitrifikavimui suvartotas kiekis} \quad (8)$$

Kitu atveju, 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  $\text{NH}_3$  verte, kuri skaičiuojama 2 priedėlyje.



**C.5. SKAIDYMAS. BIOCHEMINIS DEGUONIES SUVARTOJIMAS****1. METODAS****1.1. ĮVADAS**

Šio metodo tikslas yra išmatuoti kietųjų arba skystųjų organinių medžiagų biocheminį deguonies suvartojimą (COD).

Šiame bandyme gauti duomenys taikomi vandenyje tirpioms medžiagoms; tačiau taip pat galima bandyti, bent iš esmės, lakiąsias medžiagas arba medžiagas, kurios mažai tirpsta vandenyje.

Metodas tinka tik toms bandomosioms organinėms medžiagoms, kurios, būdamos bandyme naudojamos koncentracijos, neinhibuotų bakterijų veiklos. Jei bandomoji medžiaga nėra tiek tirpi, kad galima būtų pasiekti bandymo koncentraciją, gerai bandomosios medžiagos dispersijai gauti galima taikyti specialias priemones, pvz., dispergavimą ultragarsu.

Kai reikia aiškinti žemus rezultatus ir parinkti tinkamas bandomąsias koncentracijas, gali būti naudinga informacija apie cheminės medžiagos toksiškumą.

**1.2. APIBRĖŽTIS IR VIENETAI**

BOD apibrėžiamas kaip masė ištirpusio deguonies, suvartoto biocheminio oksidavimo procesui nustatytame tirpalo tūryje vykti apibrėžtomis sąlygomis.

Rezultatai skaičiuojami BOD gramais vienam gramui bandomosios medžiagos.

**1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS**

Pageidautina naudoti tinkamą etaloninę medžiagą, skirtą tikrinti sėjimo kultūros aktyvumą.

**1.4. BANDYMO METODO PRINCIPAS**

Gerai aeruojamoje tinkamoje terpėje ištirpinta arba disperguota medžiaga, kurios kiekis žinomas, veikiama mikroorganizmų kultūra ir tamsoje inkubuojama apibrėžtos pastovios aplinkos temperatūros sąlygomis.

BOD yra nustatomas pagal ištirpusio deguonies kiekio skirtumą bandymo pradžioje ir pabaigoje. Bandymo trukmė turi būti ne trumpesnė kaip penkios paros ir ne ilgesnė kaip 28 paros.

Lygiagrečiai turi būti daromas nustatymas tuščiajame bandinyje, kuriame nebūtų bandomosios medžiagos.

**1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI**

Negalima laikyti, kad BOD nustatymas yra tinkamas medžiagos biologinio skaidumo nustatymas. Į šį bandymą galima žiūrėti tik kaip į atrankos bandymą.

**1.6. BANDYMO METODO APRAŠYMAS**

Ruošiamas pradinis medžiagos tirpalas arba dispersija gauti BOD koncentracijai, atitinkančiai taikomą metodą. Tuomet pagal bet kurį tinkamą nacionalinį arba tarptautinį standartizuotą metodą nustatomas BOD.

**2. DUOMENYS IR VERTINIMAS**

BOD pradiniame tirpale skaičiuojamas pagal parinktą standartinį metodą ir verčiamas į BOD gramus vienam gramui bandomosios medžiagos.

3. **ATASKAITA**

Turi būti nurodytas taikytas metodas.

Biocheminis deguonies suvartojimas turi būti bent trijų tinkamų matavimų vidurkis.

Turi būti pateikta visa rezultatams aiškinti reikalinga informacija ir pastabos, ypač apie priemaišas, fizinę būseną, toksiškumo įtaką ir medžiagai būdingą sudėtį, kuri turėtų įtakos rezultatams.

Turi būti nurodyta, ar buvo naudotas biologinio nitrifikavimo inhibavimo priedas.

4. **NUORODOS**

Standartizuotų metodų sąrašas, pavyzdžiui:

NF T 90–103: Biocheminio deguonies suvartojimo nustatymas

NBN 407: Biocheminis deguonies suvartojimas

NEN 3235 5.4: Biocheminio deguonies suvartojimo (BDS) nustatymas.

Biocheminio deguonies suvartojimo nustatymas. Vandens ir susijusių medžiagų tyrimo metodai, HMSO, Londonas.

ISO 5815: Biocheminio deguonies suvartojimo nustatymas po n dienų.

## C.6. SKAIDYMAS. CHEMINIS DEGUONIES SUVARTOJIMAS

## 1. METODAS

## 1.1. ĮVADAS

Šio metodo tikslas yra standartiniu sutartu būdu išmatuoti kietųjų arba skystųjų organinių medžiagų cheminį deguonies suvartojimą (COD) nustatytomis laboratorinėmis sąlygomis.

Atliekant šį bandymą ir aiškinant gautus rezultatus bus naudinga informacija apie medžiagos formulę (pvz., halogenų druskos, organinių junginių geležies (II) druskos, chloro organiniai junginiai).

## 1.2. APIBRĖŽTYS IR VIENETAI

Cheminis deguonies suvartojimas yra medžiagos oksiduojamumo matas, reiškiamas ekvivalentiniu oksiduojančio reagento, kurį suvartoja medžiaga nustatytomis laboratorinėmis sąlygomis, deguonies kiekiu.

Rezultatas skaičiuojamas COD gramais vienam gramui bandomosios medžiagos.

## 1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Nebūtina kiekvienu atveju, kai tiriama nauja medžiaga, naudoti etalonines medžiagas. Jas daugiausia reikia naudoti tuomet, kai kartkartėmis daroma metodo veiksmingumo patikra ir norint lyginti rezultatus, kai taikomas kitas metodas.

## 1.4. BANDYMO METODO PRINCIPAS

Iš anksto nustatytas vandenyje ištirpintos arba disperguotos medžiagos kiekis dvi valandas oksiduojamas, su grįžtamuju 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 <sup>(1)</sup>.

## 1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

Dėl to, kad tai sutartinis nustatymo būdas, COD yra „oksiduojamumo indikatorius“ ir naudojamas kaip praktinis organinės medžiagos kiekio nustatymo metodas.

Bandymui gali trukdyti chloridas; taip pat nustatant COD gali trukdyti neorganinės redukuojančios arba oksiduojančios medžiagos.

Kai kurie cikliniai junginiai ir didelis skaičius lakiųjų medžiagų (pvz., mažesnės molekulinės masės sočiosios rūgštys) šiame bandyme nėra visiškai oksiduojamos.

## 1.6. BANDYMO METODO APRAŠYMAS

Ruošiamas pradinis medžiagos tirpalas arba dispersija COD vertei nuo 250 mg iki 600 mg litre gauti.

*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.

<sup>(1)</sup> Norint išvengti gyvsidabrio išsisklaidymo aplinkoje, panaudoti tirpalai su gyvsidabrio druskomis turi būti apdoroti.

Dažnai, ir ypač mažai tirpių medžiagų atveju, cheminį deguonies suvartojimą (COD) geriau nustatyti taikant metodo pakeitimą, t. y. uždaroje sistemoje su slėgio lygintuvu (H. Kelkenberg, 1975). Taikant šį metodo keitimą, dažnai galima sėkmingai kiekybiškai nustatyti junginius, pvz., acto rūgštį, kuriuos standartiniu metodu nustatyti sunku. Tačiau ir šiuo metodu nepasiseka nustatyti piridino. Jei kalio dichromato koncentracija, kaip nurodyta 1 nuorofoje, padidinama iki 0,25 N (0,0416 M), palengvėja tiesioginis 5–10 mg medžiagos svėrimas, kas yra svarbu nustatant mažai vandenyje tirpių medžiagų COD (2 nuoroda).

Kitu atveju COD nustatomas pagal bet kurį atitinkamą nacionalinį arba tarptautinį standartizuotą metodą.

## 2. DUOMENYS IR VERTINIMAS

Bandymų kolboje turimas COD skaičiuojamas pagal pasirinktą standartizuotą metodą ir verčiamas į COD gramus vienam gramui bandomosios medžiagos.

## 3. ATASKAITA

Turi būti nurodytas taikytas etaloninis metodas.

Cheminis deguonies suvartojimas turi būti bent trijų matavimų vidurkis. Turi būti pateikta visa rezultatams aiškinti reikalinga informacija ir pastabos, ypač apie priemaišas, fizinę būseną ir medžiagai būdingas savybes (jei žinomos), kurios turėtų įtakos rezultatams.

Ataskaitoje turi būti nurodyta apie gyvsidabrio (II) sulfato naudojimą nustatymui trukdančio chlorido įtakai mažinti.

## 4. NUORODOS

- 1) Kelkenberg, H., Z. von Wasser und Abwasserforschung, 1975, vol. 8, 146.
- 2) Gerike, P. The biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, vol. 13, 169.

Standartizuotų metodų sąrašas, pvz.:

NBN T 91–201 Cheminio deguonies suvartojimo nustatymas.

ISBN O 11 7512494 Cheminis deguonies suvartojimas (dichromato vertė) užterštuose vandenyse ir nuotekose.

NF T 90–101 Cheminio deguonies suvartojimo nustatymas.

DS 217 = Vandens analizė. Cheminio deguonies suvartojimo nustatymas.

DIN 38409-H-41 Cheminio deguonies suvartojimo (COD) nustatymas intervale virš 15 mg/l.

NEN 3235 5.3 Cheminio deguonies suvartojimo nustatymas.

ISO 6060 Vandens kokybė. Dichromato metodai cheminiam deguonies suvartojimui nustatyti.

**C.7. SKAIDYMAS. ABIOTINIS SKAIDYMAS. HIDROLIZĖ KAIP pH FUNKCIJA****1. METODAS**

Šis bandymo metodas atitinka OECD TG 111 (2004).

**1.1. ĮVADAS**

Cheminės medžiagos gali patekti į paviršinius vandenį tiesiogiai jų pridėdant, pasklidus purškiamoms medžiagoms, dėl nuotėkio, drenažo, atliekų šalinimo, pramoninių, buitinių arba žemės ūkio nuotekų ir nuosėdų iš atmosferos, o vandenyje gali pasikeisti vykstant cheminiams (pvz., hidrolizės, oksidacijos), fotocheminiams ir (arba) mikrobiologiniams procesams. Šioje rekomendacijoje aprašytas laboratorinis bandymo metodas, skirtas cheminių medžiagų abiotiniam hidroliziniam virsmui vandens sistemose įvertinti, esant aplinkoje dažniausiai pasitaikančioms pH vertėms (pH 4–9). Rekomendacija grindžiama jau priimtomis rekomendacijomis (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7).

Bandymai atliekami siekiant nustatyti: i) bandomosios medžiagos hidrolizės greitį kaip pH funkciją ir ii) konkrečius hidrolizės produktus, galinčius veikti organizmus, arba jų tipą ir susidarymo bei išnykimo greitį. Tokius tyrimus gali reikėti atlikti su cheminėmis medžiagomis, kurios tiesiogiai dedamos į vandenį arba kurios gali patekti į aplinką kitais pirmiau aprašytais būdais.

**1.2. APIBRĖŽTYS IR VIENETAI**

Žr. 2 priedėlį.

**1.3. BANDYMO METODO TINKAMUMAS**

Bandymo metodas iš esmės tinka visoms cheminėms medžiagoms (nežymėtosioms arba žymėtosioms), kurioms nustatyti yra sukurtas pakankamo tikslumo ir jautrio analizės metodas. Jis taikytinas mažai lakiems ir nelakiems pakankamai tirpiems vandenyje junginiams. Bandymas neturėtų būti taikomas cheminėms medžiagoms, kurios labai greitai išgaruoja iš vandens (pvz., fumigantai, organiniai tirpikliai), todėl negali būti laikomos tirpale šio bandymo sąlygomis. Taikant šį bandymo metodą gali būti sunku bandyti vandenyje labai mažai tirpias medžiagas (8).

**1.4. BANDYMO METODO PRINCIPAS**

Sterilūs vandeniniai skirtingų pH verčių (pH 4, 7 ir 9) buferiniai tirpalai apdorojami bandomąja medžiaga ir inkubuojami tamsoje kontroliuojamomis laboratorijos sąlygomis (esant pastoviai temperatūrai). Kas tam tikrą laiką tarpą buferiniai tirpalai analizuojami bandomajai medžiagai ir hidrolizės produktams nustatyti. Naudojant žymėtąją bandomąją medžiagą (pvz.,  $^{14}\text{C}$ ), lengviau galima nustatyti masių balansą.

Šis bandymo metodas yra pakopinis. Šios pakopos parodytos ir paaiškintos 1 priedėlyje. Kiekvieną pakopą lemia ankstesnės pakopos rezultatai.

**1.5. INFORMACIJA APIE BANDOMĄJĄ MEDŽIAGĄ**

Hidrolizės greičiui matuoti gali būti naudojama nežymėtoji arba žymėtoji bandomoji medžiaga. Paprastai geriau naudoti žymėtąją medžiagą, kai reikia tirti hidrolizės kelią ir nustatyti masių balansą; tačiau tam tikrais atvejais žymėjimas nėra būtinas. Rekomenduojama žymėti  $^{14}\text{C}$ , tačiau gali būti naudojami ir kiti izotopai, pvz.,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^3\text{H}$ . Jei įmanoma, žymėtasis atomas turėtų būti patvariausioje (-iose) molekulės dalyje (-yse). Pz., 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 žymėtoju atomu kitimui įvertinti ir atitinkamai informacijai apie hidrolizės produktų susidarymą gauti. Bandomosios medžiagos grynumas turi būti bent 95 %.

Prieš atliekant hidrolizės bandymą, reikėtų turėti tokią informaciją apie bandomąją medžiagą:

- a) tirpumas vandenyje [A.6 bandymo metodas];
- b) tirpumas organiniuose tirpikliuose;
- c) garų slėgis [A.4 bandymo metodas] ir (arba) Henrio dėsnio konstanta;

- d) pasiskirstymo koeficientas (n-oktanolis/vanduo) [A.8 bandymo metodas];
- e) disociacijos konstanta ( $pK_a$ ) [112 OECD rekomendacija] (9);
- f) tiesioginio ir netiesioginio fotocheminio transformavimo vandenyje greitis, jei tinka.

Reikėtų turėti analizės metodus bandomosios medžiagos kiekiui nustatyti ir, jei tinka, hidrolizės produktams ir jų kiekiui vandeniniuose tirpaluose nustatyti (žr. 1.7.2 skirsnį).

## 1.6. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Jei įmanoma, turėtų būti naudojamos etaloninės medžiagos hidrolizės produktams ir jų kiekiui nustatyti, taikant spektroskopinius ir chromatografijos metodus arba kitus tinkamo jautrumo metodus.

## 1.7. KOKYBĖS KRITERIJAI

### 1.7.1. Atgavimas

Bent dviejų kartotinių buferinių tirpalų ėminių arba jų ekstraktų analizė iškart po bandomosios medžiagos pridėjimo yra pirmasis analizės metodo pakartojamumo ir bandomosios medžiagos įdėjimo metodikos tolygumo rodiklis. Vėlesnių bandymo etapų atgavimo laipsnis gaunamas atliekant masių balansą (kai naudojama žymėtoji medžiaga). Žymėtųjų ir nežymėtųjų cheminių medžiagų atgavimo laipsnis turi būti nuo 90 % iki 110 % (7). Jei šį intervalą techniškai sunku pasiekti, nežymėtosioms cheminėms medžiagoms leidžiamas 70 % atgavimo laipsnis, tačiau jį reikia pagrįsti.

### 1.7.2. Analizės metodo pakartojamumas ir jautrumas

Vėliau analizės metodo (-ų), taikyto (-ų) bandomajai medžiagai ir hidrolizės produktams kiekybiškai nustatyti, pakartojamumas gali būti tikrinamas atliekant tų pačių buferinių tirpalų (arba jų ekstraktų) kartotinę analizę, kai susidaro kiekybiniam nustatymui pakankamas hidrolizės produktų kiekis.

Analizės metodas turi būti pakankamai jautrus bandomajai medžiagai kiekybiškai nustatyti, kai jos koncentracija sumažėja iki 10 % pradinės koncentracijos arba dar labiau. Be to, prireikus analizės metodai turi būti pakankamai jautrūs visų hidrolizės produktų kiekiui nustatyti, kai jie sudaro 10 % arba daugiau įdėtos medžiagos koncentracijos (bet kuriuo tyrimo metu) iki 25 % arba mažiau jų didžiausios koncentracijos.

### 1.7.3. Hidrolizės kinetikos duomenų 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 stiklo sorbuotos bandomosios medžiagos ir hidrolizės produktų masę,
- naudoti ultragarso vonią,
- užtikrinti, kad kiekvienu bandinio ėmimo laikotarpiu visi stikliniai indai būtų plaunami tirpikliu,
- naudoti produktų preparatus,

- naudoti padidintą antrojo tirpiklio kiekį bandomajai medžiagai į sistemą įdėti; jei naudojamas antrasis tirpiklis, jis neturėtų sukelti bandomosios medžiagos hidrolizės.

Paprastai reikia turėti purtykles su reguliuojamos temperatūros vandens vonia arba reguliuojamos temperatūros inkubatorius įvairiems bandomiesiems tirpalams inkubuoti.

Reikia turėti tipinę laboratorinę įrangą, įskaitant, visų pirma, šią:

- pH metrą,
- analizės prietaisus, pvz., dujų chromatografijos (GC), efektyviosios skysčių chromatografijos (HPLC), plonasluoksnės chromatografijos (TLC) įrangą, įskaitant atitinkamas aptikimo sistemas žymėtosioms ir nežymėtosioms medžiagoms analizuoti arba atvirkštinio izotopų skiedimo metodo įrangą,
- nustatymo prietaisus (pvz., MS, GC-MS, HPLC-MS, MBR ir t. t.),
- skysčių scintiliacinį skaitiklį,
- dalijamuosius piltuvus, skirtus skysčius ekstrahuoti skysčiais,
- įrangą tirpalams ir ekstraktams koncentruoti (pvz., sukamąjį garintuvą),
- temperatūros reguliavimo įtaisą (pvz., vandens vonią).

Cheminius reagentus sudaro, pvz.:

- analiziškai gryni organiniai tirpikliai, pvz., heksanas, dichlormetanas ir kt.,
- scintiliacinis skystis,
- buferiniai tirpalai (išsami informacija pateikta 1.8.3 skirsnyje).

Visi hidrolizės bandymams naudojami stikliniai indai, analiziškai grynas vanduo ir buferiniai tirpalai turėtų būti sterilizuoti.

### 1.8.2. Bandomosios medžiagos įdėjimas

Tiriamoji medžiaga turi būti įpilama kaip vandeninis tirpalas į skirtingus buferinius tirpalus (žr. 3 priedėlį). Jei būtina siekiant užtikrinti tinkamą ištirpinimą, bandomosios medžiagos įdėjimui ir paskirstymui leidžiama naudoti nedidelį su vandeniu maišių tirpiklių kiekį (pvz., acetonitrilo, acetono, etanolio), bet jis paprastai turi būti ne didesnis kaip 1 % v/v. Jei numatoma naudoti didesnę tirpiklių koncentraciją (pvz., mažai tirpių bandomųjų medžiagų atveju), tai galėtų būti leistina tik tais atvejais, kai galima įrodyti, kad tirpiklis neturi įtakos bandomųjų medžiagų hidrolizei.

Preparatų paprastai nerekomenduojama naudoti, nes negalima atmesti galimybės, kad preparato ingredientai gali paveikti hidrolizės procesą. Tačiau jei bandomosios medžiagos yra mažai tirpios vandenyje arba limpa prie stiklo (ž. 1.8.1 skirsnį), preparato naudojimas gali būti tinkama išeitis.

Naudojama tik viena bandomosios medžiagos koncentracija; ji neturi būti didesnė kaip 0,01 mol/l arba kaip pusė soties koncentracijos (žr. 1 priedėlį).

### 1.8.3. Buferiniai tirpalai

Hidrolizės bandymas turi būti atliekamas, kai pH vertės yra 4, 7 ir 9. Todėl buferiniai tirpalai turi būti paruošiami naudojant analiziškai grynus reagentus ir vandenį. Kai kurios tinkamos buferinės sistemos pateiktos 3 priedėlyje. Reikia pažymėti, kad naudojama buferinė sistema gali daryti įtaką hidrolizės greičiui, ir, kai tai stebima, reikia naudoti kitą buferinę sistemą <sup>(1)</sup>.

(1) Mabey ir Mill rekomenduoja vietoj fosfatinio naudoti boratinį arba acetatinį buferinį tirpalą (11).

Kiekvieno buferinio tirpalo pH vertė turi būti tikrinama kalibruotu pH-metru, kurio tikslumas būtų bent 0,1, esant reikiamai temperatūrai.

#### 1.8.4. **Bandymo sąlygos**

##### 1.8.4.1. *Bandymo temperatūra*

Hidrolizės bandymai turėtų būti atliekami esant pastoviai temperatūrai. Norint ekstrapoliuoti, svarbu užtikrinti temperatūros pastovumą bent  $\pm 0,5$  °C tikslumu.

Pradinis bandymas (1 pakopa) atliekamas 50 °C temperatūroje, jei nežinomos bandomosios medžiagos hidrolizės savybės. Aukštesnių pakopų kinetiniai bandymai atliekami esant bent trimis 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 kuri patektų ataskaitoje pateikiama 25 °C temperatūra ir didesnė dalis lauko sąlygomis pasitaikančios temperatūros verčių.

##### 1.8.4.2. *Šviesa ir deguonis*

Visi hidrolizės bandymai turėtų būti atliekami taikant bet kurį iš tinkamų metodų, kuris leistų išvengti fotolizės reiškinių. Reikėtų imtis visų tinkamų priemonių, kad nepatektų deguonis (pvz., prieš ruošiant tirpalą, 5 minutes barbotuoti helį, azotą arba argoną).

##### 1.8.4.3. *Bandymo trukmė*

Pradinis bandymas turėtų būti atliekamas 5 paras, o aukštesniųjų pakopų bandymai turėtų būti atliekami tol, kol hidrolizuojasi 90 % bandomosios medžiagos, bet ne ilgiau kaip 30 parų.

#### 1.8.5. **Bandymo procedūra**

##### 1.8.5.1. *Pradinis bandymas (1 pakopa)*

Pradinis bandymas atliekamas esant  $50 \pm 0,5$  °C ir pH 4,0, 7,0 ir 9,0. Jei po 5 parų hidrolizuojasi mažiau kaip 10 % ( $t_{0,5, 25\text{ °C}} > 1$  metai) medžiagos, bandomoji medžiaga priskiriama hidrolizei atsparioms medžiagoms ir paprastai daugiau bandyti nereikia. Jei žinoma, kad medžiaga yra nepatvari <sup>(1)</sup> aplinkos temperatūrą atitinkančiomis sąlygomis, pradinio bandymo atlikti nereikia. Analizės metodas turi būti pakankamai tikslus ir jautrus, kad juo būtų galima nustatyti pradinės koncentracijos sumažėjimą 10 %.

##### 1.8.5.2. *Nepatvarių medžiagų hidrolizė (2 pakopa)*

Aukštesnės pakopos (sudėtingesnis) bandymas turi būti atliekamas esant tokioms pH vertėms, kurioms esant pradinio bandymo metu buvo nustatytas medžiagos nepatvarumas. Pasirinkta bandomosios medžiagos buferinių tirpalų temperatūra palaikoma naudojant termostatą. Pirmojo laipsnio hidrolizei patikrinti, kiekvienas reakcijos tirpalas turėtų būti analizuojamas tokiais laiko tarpais, kad būtų gauti bent šeši atskiri duomenų taškai – paprastai nuo 10 % iki 90 % pradinės medžiagos hidrolizės. Atskiri kartotiniai bandiniai (bent du bandiniai iš atskirų reakcijos indų) imami ir jų turinys analizuojamas bent šešis kartus (kad būtų gauta ne mažiau kaip dvylika kartotinių duomenų taškų). Laikoma, kad nepakanka naudoti vieną didelį ėminį, iš kurio būtų imamos atskiros alikvotinės bandomojo tirpalo dalys kiekvienu mėginio ėmimo momentu, kadangi toks būdas neleidžia analizuoti duomenų kintamumo ir gali kilti problemų dėl bandomojo tirpalo užteršimo. Sterilumo patvirtinimo bandymai turėtų būti atliekami baigus aukštesnės pakopos bandymą (t. y. įvykus 90 % hidrolizei arba po 30 parų). Tačiau jei skaidymas (t. y. virusas) nestebimas, sterilumo bandymų atlikti nebūtina.

##### 1.8.5.3. *Hidrolizės produktų nustatymas (3 pakopa)*

Visi pagrindiniai hidrolizės produktai, bent tie, kurie sudaro > 10 % naudotos dozės, turėtų būti nustatomi taikant tinkamus analizės metodus.

##### 1.8.5.4. *Neprivalomi bandymai*

Hidrolizei neatsparią bandomąją medžiagą gali tekti bandyti papildomai, esant kitoms nei 4, 7 ir 9 pH vertėms. Pvz., dėl fiziologinių priežasčių gali reikėti atlikti bandymą rūgštesnėje terpėje (pvz., kai pH yra 1,2) ir esant vienai fiziologiškai artimai temperatūros vertei (37 °C).

<sup>(1)</sup> Tokią informaciją galima gauti iš kitų šaltinių, pvz., giminingos struktūros junginių hidrolizės duomenys, nurodyti literatūroje arba gauti atliekant kitus pradinius, pusiau kiekybinius bandomosios medžiagos hidrolizės bandymus ankstesnėje parengtinėje stadijoje.



## 2. DUOMENYS

Bandomosios medžiagos ir hidrolizės produktų, jei jų yra, kiekis, nustatytas kiekvienu bandinio ėmimo etapu, kiekvienai pH vertei bei bandymo temperatūrai, turėtų būti nurodytas įdėtos pradinės koncentracijos % ir, prireikus, mg/l. Be to, naudojant žymėtąją bandomąją medžiagą, turėtų būti pateikiamas masių balansas, išreikštas įdėtos pradinės medžiagos koncentracijos procentine dalimi.

Ataskaitoje pateikiamas logaritminis bandomosios medžiagos koncentracijos kaip laiko funkcijos duomenų grafikas. Be to, turi būti nustatyti visi pagrindiniai hidrolizės produktai, bent tie, kurių kiekis sudaro  $\geq 10\%$  įdėtos dozės, ir jų susidarymo bei išnykimo greičiams parodyti turi būti gauti jų koncentracijos logaritmo kaip laiko funkcijos grafikai, kokie buvo gauti pradinės medžiagos atveju.

### 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 pasiklovimo ribas) pateikiamos kiekvienai pH ir temperatūros vertei, kartu aprašomas taikytas modelis, kinetikos laipsnis ir nustatymo koeficientas ( $r^2$ ). Be to, jei tinka, apskaičiavimai taikomi hidrolizės produktams.

Atliekant greičio tyrimus, esant skirtingoms temperatūros vėrtėms, pseudopirmojo laipsnio hidrolizės greičio konstantos ( $k_{obs}$ ) turėtų būti aprašytos kaip temperatūros funkcija. Apskaičiavimas turėtų būti pagrįstas  $k_{obs}$  konstantos padalijimu į hidrolizės, katalizuojamos rūgštine, neutralia ir šarmine terpe, konstantas (atitinkamai  $k_H$ ,  $k_{neutral}$  ir  $k_{OH}$ ) ir Arenijaus lygtimi:

$$k_{obs} = (k_H [H^+]) + (k_{neutral}) + (k_{OH} [OH^-]) = \left( \sum_{i=H,neutral,OH} (A_i e^{-B_i/T}) \right)$$

kurioje  $A_i$  ir  $B_i$  yra geriausias 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 vėrtėms, kurioms tiesioginis greičio konstantos nustatymas bandymo keliu yra neįmanomas (10).

### 2.2. REZULTATŲ ĮVERTINIMAS IR AIŠKINIMAS

Didžioji dalis hidrolizės reakcijų vyksta pseudopirmojo laipsnio reakcijos greičiu, taigi pusėjimo trukmės vertės nepriklauso nuo koncentracijos (žr. 2 priedėlio 4 lygtį). Dėl šios priežasties laboratorinius rezultatus, gautus 10–2–10–3 mol/l, paprastai galima taikyti aplinkos sąlygoms ( $\leq 10^{-6}$  mol/l) (10). Kelis įvairių cheminių medžiagų hidrolizės greičių, išmatuotų švariame ir gamtiniame vandenyje, gero sutapimo pavyzdžius, jei buvo matuojamos pH ir temperatūros vėrtės, paskelbė Mabey ir Mill (11).

## 3. ATASKAITA

### 3.1. BANDYMO ATASKAITA

Bandymo ataskaitoje turi būti bent ši informacija:

Bandomoji medžiaga:

- įprastas pavadinimas, cheminis pavadinimas, CAS numeris, struktūrinė formulė (rodanti žymėtojo atomo padėtį, jei naudojama žymėtoji medžiaga) ir atitinkamos fizikinės ir cheminės savybės (žr. 1.5 skirsnį),
  - bandomosios medžiagos grynumas (priemaišos),
  - radiocheminis žymėtosios cheminės medžiagos grynumas ir molinis aktyvumas (jei tinka).
- Buferiniai tirpalai:
- ruošimo datos ir išsami informacija,

- naudoti buferiniai tirpalai ir vanduo,
- buferinių tirpalų molinė koncentracija ir pH.

Bandymo sąlygos:

- tyrimų atlikimo datos,
- įdėtos bandomosios medžiagos kiekis,
- metodai ir tirpikliai (tipas ir kiekis), naudoti bandomajai medžiagai iždėti,
- inkubuojamų buferuotų bandomosios medžiagos tirpalų tūris,
- naudotos inkubavimo sistemos aprašymas,
- pH ir temperatūra tyrimo laikotarpiu,
- mėginių ėmimo laikas,
- ekstrahavimo metodas (-ai),
- bandomosios medžiagos ir jos hidrolizės buferiniuose tirpaluose kiekybinio nustatymo ir identifikavimo metodai,
- kartotinių bandinių skaičius.

Rezultatai:

- taikytų analizės metodų pakartojamumas ir jautrumas,
- atgavimo laipsnio vertės (tinkamu patvirtinto tyrimo % vertės yra pateiktos 1.7.1 skirsnyje),
- kartotinių bandinių duomenys ir vidurkiai lentelių pavidalu,
- masių balansas tyrimų eigoje ir jų pabaigoje (kai naudojama žymėtoji bandomoji medžiaga),
- pradinio bandymo rezultatai,
- rezultatų aptarimas ir aiškinimas,
- visi pradiniai duomenys ir skaičiai.

Šią informaciją reikia pateikti tik nustačius hidrolizės greitį:

- bandomosios medžiagos ir, jei tinka, hidrolizės produktų koncentracijos verčių kaip laiko funkcijos grafikus kiekvienai pH ir temperatūros vertei,
- Arenijaus lygties rezultatų duomenis esant 20 °C/25 °C temperatūrai, pH vertes, greičio konstantą [ $\text{h}^{-1}$  arba  $\text{para}^{-1}$ ], pusėjimo trukmę arba  $\text{DT}_{50}$ , temperatūros vertes [°C], įskaitant pasiklivimo ribas ir koreliacijos koeficientus ( $r^2$ ), arba palyginamąją informaciją;
- siūlomą hidrolizės kelią.

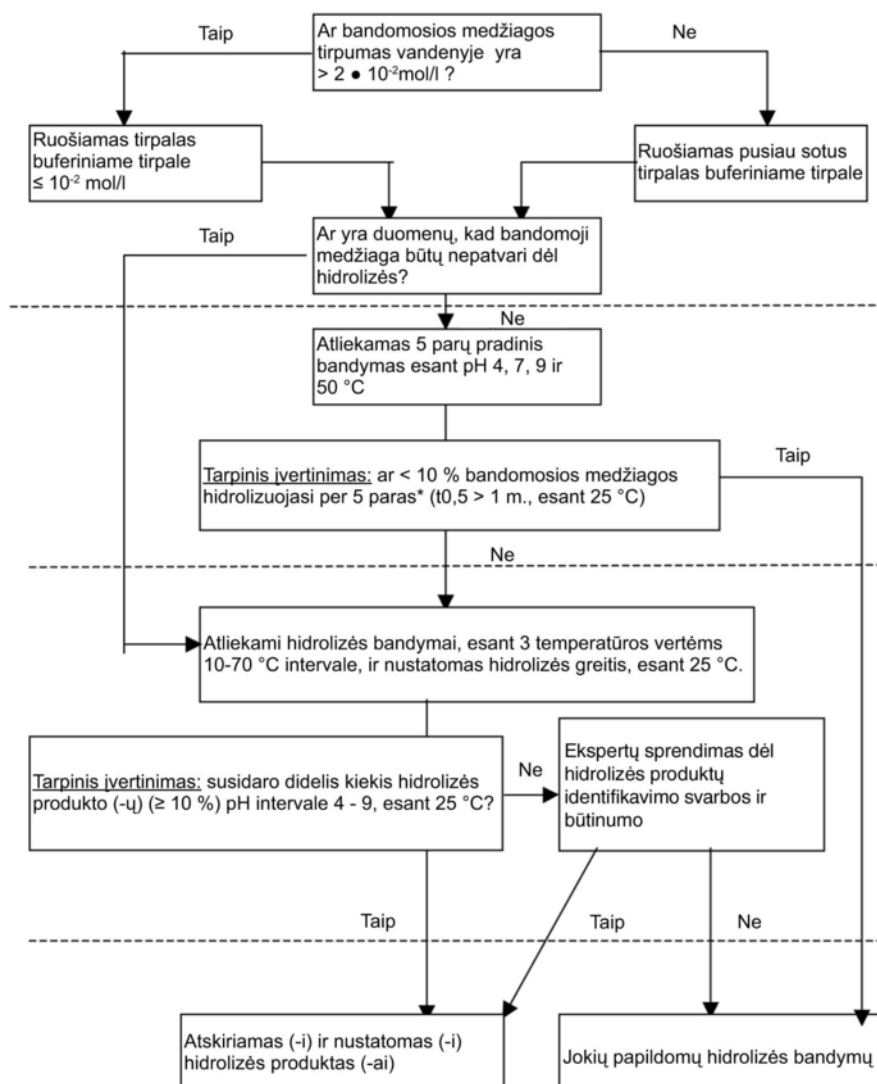
4.

**NUORODOS**

- 1) OECD (1981). Hydrolysis as a Function of pH. OECD Guideline for Testing of Chemicals Nr. 111, adopted 12 May 1981.
- 2) US-Environmental Protection Agency (1982). 40 CFR 796.3500, Hydrolysis as a Function of pH at 25 °C. Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental Fate.
- 3) Agriculture Canada (1987). Environmental Chemistry and Fate Guidelines for registration of pesticides in Canada.
- 4) European Union (ES) (1995). Commission Directive 95/36/EC amending Council Directive 91/414/EEC concerning the placing of plant protection products on the market. Annex V: Fate and Behaviour in the Environment.
- 5) Dutch Commission for Registration of Pesticides (1991). Application for registration of a pesticide. Section G: Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.
- 6) BBA (1980). Merkblatt Nr. 55, Teil I und II: Prüfung des Verhaltens von Pflanzenbehandlungsmitteln im Wasser (October 1980).
- 7) SETAC (1995). Procedures for Assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides. Mark R. Lynch, Ed.
- 8) OECD (2000). Guidance document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures, OECD Environmental Health and SAFETY Publications Series on Testing and Assessment Nr. 23.
- 9) OECD (1993). Guidelines for the Testing of Chemicals. Paris. OECD (1994–2000): Addenda 6–11 to Guidelines for the Testing of Chemicals.
- 10) Nelson, H, Laskowski D, Thernes 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 14<sup>th</sup> 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.

## 1 priedėlis

## Pakopinio hidrolizės bandymo schema



\* Bandomosios medžiagos hidrolizės laipsnis 10 %, esant 50 °C, atitinka maždaug 30 parų pusėjimo trukmę, o tai atitinka maždaug 1 metų vertę, esant 25 °C Nu

## 2 priedėlis

## Apibrėžtys ir vienetai

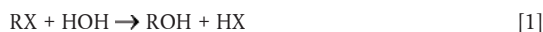
Visais atvejais turėtų būti naudojami *Tarptautinės vienetų sistemos (SI)* vienetai.

**Bandomoji medžiaga** – bet kuri medžiaga, ar tai būtų pradinis junginys ar atitinkami virsmo produktai.

**Virsmo produktai** – visos medžiagos, susidarancios vykstant biotiniam arba abiotiniam bandomosios medžiagos virsmui.

**Hidrolizės produktai** – visos medžiagos, susidarancios 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:

$$\begin{array}{ll} \text{greitis} = k [\text{H}_2\text{O}] [\text{RX}] & \text{antrojo laipsnio reakcija} \\ & \text{arba} \\ \text{greitis} = k [\text{RX}] & \text{pirmojo laipsnio reakcija} \end{array}$$

priklausomai nuo greitį ribojančios stadijos. Kadangi palyginus su bandomosios medžiagos koncentracija vandens perteklius yra didelis, šio tipo reakcija paprastai aprašoma pseudopirmojo laipsnio reakcija, kurios stebima greičio konstanta aprašoma lygtimi:

$$k_{\text{obs}} = k [\text{H}_2\text{O}] \quad [2]$$

ir gali būti nustatyta taikant šią išraišką (\*):

$$k_{\text{obs}} = \left( \frac{1}{t} \right) \ln \left( \frac{C_0}{C_t} \right) \quad [3]$$

čia t – laikas,

$C_0, C_t$  – RX koncentracija laike 0 ir t.

Šios konstantos vienetų dimensija (laikas)<sup>-1</sup>, o reakcijos pusėjimo trukmė (laikas, per kurį sureaguoja 50 % RX) aprašoma lygtimi:

$$t_{0,5} = \left( \frac{\ln 2}{k_{\text{obs}}} \right) \quad [4]$$

**Pusėjimo trukmė ( $t_{0,5}$ )** – laikas, per kurį hidrolizuojasi 50 % bandomosios medžiagos, kai reakcija gali būti aprašyta pirmojo laipsnio kinetika; trukmė nepriklauso nuo koncentracijos.

**DT<sub>50</sub> (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.

(\*) Jei logaritminis duomenų kaip laiko funkcijos grafikas nėra tiesė (aprašanti pirmojo laipsnio reakcijos greitį), [3] lygtis netinka bandomojo junginio hidrolizės greičio konstantai nustatyti.

**k įvertinimas esant skirtingoms temperatūros vertėms**

Kai reakcijos greičio konstantos žinomos dviem temperatūros vertėms, reakcijos greičio konstantos vertės kitai temperatūrai gali būti apskaičiuotos taikant Arenijaus lygtį:

$$k = \left( A \times e^{-\frac{E}{R \times T}} \right) \text{ arba } \ln k = \left( \frac{-E}{R \times T} \right) + \ln A$$

$\ln k$  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:

$$E = R \times \left( \frac{\ln k_2 - \ln k_1}{\left( \frac{1}{T_1} \right) - \left( \frac{1}{T_2} \right)} \right)$$

čia:  $T_2 > T_1$ .

---

## 3 priedėlis

## Buferinių tirpalų sistemos

## A. CLARK IR LUBS

## CLARK ir LUBS buferiniai mišiniai (\*)

Sudėtis	pH
<i>0,2 N HCl ir 0,2 N KCl esant 20 °C</i>	
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
<i>0,1 M kalio biftalato + 0,1 N HCl esant 20 °C</i>	
46,70 ml 0,1 N HCl + 50 ml biftalato iki 100 ml	2,2
39,60 ml 0,1 N HCl + 50 ml biftalato iki 100 ml	2,4
32,95 ml 0,1 N HCl + 50 ml biftalato iki 100 ml	2,6
26,42 ml 0,1 N HCl + 50 ml biftalato iki 100 ml	2,8
20,32 ml 0,1 N HCl + 50 ml biftalato iki 100 ml	3,0
14,70 ml 0,1 N HCl + 50 ml biftalato iki 100 ml	3,2
9,90 ml 0,1 N HCl + 50 ml biftalato iki 100 ml	3,4
97 ml 0,1 N HCl + 50 ml biftalato iki 100 ml	3,6
2,63 ml 0,1 N HCl + 50 ml biftalato iki 100 ml	3,8
<i>0,1 M kalio biftalato + 0,1 N NaOH esant 20 °C</i>	
0,40 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalato iki 100 ml	4,0
3,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalato iki 100 ml	4,2
7,50 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalato iki 100 ml	4,4
12,15 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalato iki 100 ml	4,6
17,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalato iki 100 ml	4,8

(\*) Šiose lentelėse pateiktos pH vertės buvo apskaičiuotos pagal potencialo matavimus, taikant Sorensen standartines lygtis (1909 m.). Atitinkamos pH vertės yra 0,04 vieneto didesnės nei nurodytos lentelėje.

Sudėtis	pH
23,85 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalato iki 100 ml	5,0
29,95 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalato iki 100 ml	5,2
35,45 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalato iki 100 ml	5,4
39,85 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalato iki 100 ml	5,6
43,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalato iki 100 ml	5,8
45,45 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalato iki 100 ml	6,0

**CLARK ir LUBS buferiniai mišiniai (tęsinys)**

<i>0,1 M kalio dihidrofosfato + 0,1 N NaOH esant 20 °C</i>	
5,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfato iki 100 ml	6,0
8,60 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfato iki 100 ml	6,2
12,60 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfato iki 100 ml	6,4
17,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfato iki 100 ml	6,6
23,45 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfato iki 100 ml	6,8
29,63 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfato iki 100 ml	7,0
35,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfato iki 100 ml	7,2
39,50 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfato iki 100 ml	7,4
42,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfato iki 100 ml	7,6
45,20 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfato iki 100 ml	7,8
46,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfato iki 100 ml	8,0
<i>0,1 M H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> + 0,1 M KCl + 0,1 N NaOH esant 20 °C</i>	
2,61 ml 0,1 N NaOH + 50 ml boro rūgšties iki 100 ml	7,8
3,97 ml 0,1 N NaOH + 50 ml boro rūgšties iki 100 ml	8,0
5,90 ml 0,1 N NaOH + 50 ml boro rūgšties iki 100 ml	8,2
8,50 ml 0,1 N NaOH + 50 ml boro rūgšties iki 100 ml	8,4
12,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml boro rūgšties iki 100 ml	8,6
16,30 ml 0,1 N NaOH + 50 ml boro rūgšties iki 100 ml	8,8
21,30 ml 0,1 N NaOH + 50 ml boro rūgšties iki 100 ml	9,0
26,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml boro rūgšties iki 100 ml	9,2



32,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml boro rūgšties iki 100 ml	9,4
36,85 ml 0,1 N NaOH + 50 ml boro rūgšties iki 100 ml	9,6
40,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml boro rūgšties iki 100 ml	9,8
43,90 ml 0,1 N NaOH + 50 ml boro rūgšties iki 100 ml	10,0

**B. KOLTHOFF IR VLEESCHOUWER**

**KOLTHOFF ir VLEESCHOUWER citratiniai buferiniai tirpalai**

Sudėtis	pH
<i>0,1 M monokalio citrato ir 0,1 N HCl, esant 18 °C (*)</i>	
49,7 ml 0,1 N HCl + 50 ml citrato iki 100 ml	2,2
43,4 ml 0,1 N HCl + 50 ml citrato iki 100 ml	2,4
36,8 ml 0,1 N HCl + 50 ml citrato iki 100 ml	2,6
30,2 ml 0,1 N HCl + 50 ml citrato iki 100 ml	2,8
23,6 ml 0,1 N HCl + 50 ml citrato iki 100 ml	3,0
17,2 ml 0,1 N HCl + 50 ml citrato iki 100 ml	3,2
10,7 ml 0,1 N HCl + 50 ml citrato iki 100 ml	3,4
4,2 ml 0,1 N HCl + 50 ml citrato iki 100 ml	3,6
<i>0,1 M monokalio citrato ir 0,1 N NaOH, esant 18 °C (*)</i>	
2,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrato iki 100 ml	3,8
9,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrato iki 100 ml	4,0
16,3 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrato iki 100 ml	4,2
23,7 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrato iki 100 ml	4,4
31,5 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrato iki 100 ml	4,6
39,2 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrato iki 100 ml	4,8
46,7 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrato iki 100 ml	5,0
54,2 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrato iki 100 ml	5,2
61,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrato iki 100 ml	5,4
68,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrato iki 100 ml	5,6
74,4 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrato iki 100 ml	5,8
81,2 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrato iki 100 ml	6,0

(\*) Apsaugai nuo pelėsių augimo įdedamas nedidelis timolio arba panašios medžiagos kristalas.

## C. SÖRENSEN

## SÖRENSEN boratiniai mišiniai

Sudėtis		Sörensen 18 °C	Walbum, pH, esant		
ml borakso	ml HCl/NaOH		10 °C	40 °C	70 °C
<i>0,05 M borato + 0,1 N HCl</i>					
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
<i>0,05 M borato + 0,1 N NaOH</i>					
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
<i>0,0667 M monokalio fosfato + 0,0667 M dinatrio fosfato, esant 20 °C</i>	
99,2 ml KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + 0,8 ml Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5,0
98,4 ml KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + 1,6 ml Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5,2
97,3 ml KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + 2,7 ml Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5,4
95,5 ml KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + 4,5 ml Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5,6
92,8 ml KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + 7,2 ml Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5,8
88,9 ml KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + 11,1 ml Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6,0
83,0 ml KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + 17,0 ml Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6,2
75,4 ml KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + 24,6 ml Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6,4
65,3 ml KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + 34,7 ml Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6,6
53,4 ml KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + 46,6 ml Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6,8

41,3 ml $\text{KH}_2\text{PO}_4$ + 58,7 ml $\text{Na}_2\text{HPO}_4$	7,0
29,6 ml $\text{KH}_2\text{PO}_4$ + 70,4 ml $\text{Na}_2\text{HPO}_4$	7,2
19,7 ml $\text{KH}_2\text{PO}_4$ + 80,3 ml $\text{Na}_2\text{HPO}_4$	7,4
12,8 ml $\text{KH}_2\text{PO}_4$ + 87,2 ml $\text{Na}_2\text{HPO}_4$	7,6
7,4 ml $\text{KH}_2\text{PO}_4$ + 92,6 ml $\text{Na}_2\text{HPO}_4$	7,8
3,7 ml $\text{KH}_2\text{PO}_4$ + 96,3 ml $\text{Na}_2\text{HPO}_4$	8,0

## C.8. TOKSIŠKUMAS SLIEKAMS

## DIRBTINIO DIRVOŽEMIO BANDYMAS

## 1. METODAS

## 1.1. ĮVADAS

Šiame laboratoriniame bandyme bandomoji medžiaga maišoma su dirbtiniu dirvožemiu, į kurį 14 parų dedami sliekai. Kai baigiasi šis laikas (ir neprivalomai po septynių parų), tiriamas medžiagos mirtinas poveikis sliekams. Bandyme pateiktas metodas, kaip daryti palyginus greitą medžiagų, kurios per odą ir virškinimo traktą veikia sliekus, poveikio patikrinimą

## 1.2. APIBRĖŽTIS IR VIENETAS

LC<sub>50</sub> – koncentracija medžiagos, dėl kurios, kaip nustatyta, per bandymo laiką žūsta 50 % bandomųjų gyvūnų.

## 1.3. ETALONINĖ MEDŽIAGA

Periodiškai naudojama etaloninė medžiaga, kaip priemonė parodyti, kad bandymo sistemos jautrumas žymiai nepakito.

Etalonine medžiaga rekomenduojama naudoti analiziškai gryną chloracetamidą.

## 1.4. BANDYMO METODO PRINCIPAS

Dirvožemis yra nepastovi terpė, todėl šiame bandyme naudojamas tiksliai apibrėžtas dirbtinis priemolio dirvožemis. Suaugę *Eisenia foetida* rūšies sliekai (žr. priedėlio pastabą) laikomi apibrėžtos sudėties dirbtiniame dirvožemyje, apdorotame įvairios koncentracijos bandomąja medžiaga. Indų turinys po 14 parų (ir neprivalomai po septynių parų) nuo bandymo pradžios yra pasklaidomas ant padėklo, ir kiekvienai naudotai koncentracijai skaičiuojami likę gyvi sliekai.

## 1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

Bandymas sudarytas taip, kad atkuriamumas bandymo substrato ir organizmo atžvilgiu būtų kiek įmanoma geresnis. Gaištumumas kontroliniuose bandiniuose bandymo pabaigoje turi būti ne didesnis kaip 10 %, kitaip bandymas yra netinkamas.

## 1.6. BANDYMO METODO APRAŠYMAS

## 1.6.1. Medžiagos

## 1.6.1.1. Bandymo substratas

Bandymo pagrindiniu substratu naudojamas apibrėžtas dirbtinis dirvožemis.

## a) Pagrindinis substratas (procentinė sudėtis skaičiuojama sausos medžiagos masei)

- 10 % samanų durpių (pH reikšmė kiek įmanoma arčiau 5,5–6,0, be matomų augalų liekanų ir smulkiai malty),
- 20 % kaolinito molio; pageidautina, kad kaolinito jame būtų daugiau kaip 50 %,
- apie 69 % pramoninio kvarco smėlio (daugiausia tai turi būti smulkus smėlis, kurio daugiau kaip 50 % dalelių dydis būtų nuo 0,05 iki 0,2 mm). Jei medžiagos dispergavimas vandenyje nepakankamas, kiekvienam bandymo indui reikėtų turėti 10 g smėlio, kurį vėliau būtų galima maišyti su bandomąja medžiaga,
- apie 1 % kalcio karbonato (CaCO<sub>3</sub>), smulkiai malto, chemiškai gryno, dedamo padidinti pH vertę iki 6,0 ± 0,5.

## b) Bandymo substratas

Bandymo substratas susideda iš pagrindinio substrato, bandomosios medžiagos ir dejonizuoto vandens.

Vanduo jame sudaro maždaug nuo 25 % iki 42 % sauso pagrindinio substrato masės. Vandens kiekis substrate nustatomas džiovinant bandinį 105 °C temperatūroje iki pastoviosios masės. Pagrindinis kriterijus – dirbtinių dirvožemių reikia drėkinti tol, kol nėra stovinčio vandens. Būtina rūpestingai maišyti, kad bandomoji medžiaga tolygiai būtų pasiskirstyta substrate. Bandomosios medžiagos įterpimo į substratą būdas turi būti nurodytas ataskaitoje.

## c) Kontrolinis substratas

Kontrolinį substratą sudaro pagrindinis substratas ir vanduo. Jei naudojamas priedas, papildomame kontroliniame bandinyje turi būti toks pat priedo kiekis.

## 1.6.1.2. Bandymo indai

Maždaug vieno litro talpos stiklinis indas (tinkamai uždengtas plastiko dangčiu, lėkštele ar plastiko plėvele su ventiliacijos angomis), užpildytas tokiu kiekiu drėgno bandymo substrato ar kontrolinio substrato, kuris atitiktų 500 g sauso substrato masę.

## 1.6.2. Bandymo sąlygos

Indai turi būti laikomi nuolat apšviestose klimato kameroje 20 ± 2 °C temperatūroje. Apšvieta turi būti nuo 400 iki 800 liuksų.

Bandymo trukmė – 14 parų, tačiau gaištamumą, pasirinktinai, galima vertinti po septynių parų nuo bandymo pradžios.

## 1.6.3. Bandymo procedūra

## Bandomosios medžiagos koncentracijos vertės

Bandomosios medžiagos koncentracija skaičiuojama medžiagos mase sauso pagrindinio substrato masei (mg/kg).

## Intervalo nustatymo bandymas

Norint turėti informaciją, kokias koncentracijas naudoti galutiniame bandyme, intervalo nustatymo bandyme gali būti nustatytas koncentracijų, dėl kurių gaištamumas kinta nuo 0 iki 100 %, intervalas.

Medžiaga turi būti išbandyta tokios koncentracijos: 1 000; 100; 10; 1; 0,1 mg medžiagos kilogramui bandymo substrato (sausos masės).

Jeigu turi būti atliekamas visas galutinis bandymas, tai intervalo nustatymo bandyme kiekvienai koncentracijai ir kontroliniam bandymui be medžiagos pakaktų po vieną bandymų partiją, kurioje būtų 10 sliekų.

## Galutinis bandymas

Intervalo nustatymo rezultatai naudojami parinkti bent penkias geometrinę progresiją sudarančias koncentracijas, kurios apima tik gaištamumo intervalą nuo 0 iki 100 % ir skiriasi pastoviu daugikliu, ne didesniu kaip 1,8.

Bandymai, naudojant tokią koncentracijų seriją, turi leisti kiek įmanoma tiksliau įvertinti LC<sub>50</sub> vertę ir jos pasiklovimo ribas.

Galutiniame bandyme kiekvienai koncentracijai ir kontroliniam bandymui be medžiagos imamos bent keturios bandymų partijos, kurių kiekvienoje būtų 10 sliekų. Šių lygiagrečių bandymų rezultatai pateikiami vidutinės vertės ir standartinio nuokrypio pavidalu.

Kai dvi gretimos koncentracijos, kurių santykis 1,8, duoda tik 0 % ir tik 100 % gaištamumą, šių dviejų verčių pakanka pažymėti intervalą, į kurį patenka LC<sub>50</sub>.

## Pagrindinio bandymo substrato ir bandomosios medžiagos maišymas

Bandymo substratas turi būti gaminamas, kai tai įmanoma, be jokių priedų, išskyrus vandenį. Prieš pat bandymo pradžią bandomosios medžiagos emulsija ar dispersija dejonizuotame vandenyje ar kitame tirpiklyje sumaišoma su pagrindiniu bandymo substratu arba tolygiai ant jo užpurškiama plonu chromatografiniu ar panašios rūšies purkštuvu.

Jei bandomoji medžiaga netirpsta vandenyje, ji gali būti ištirpinta kuo mažesniame tinkamo organinio tirpiklio tūryje (pvz., heksane, acetone ar chloroforme).

Bandomajai medžiagai tirpinti, disperguoti ar emulguoti galima naudoti tik lengvai garuojančias medžiagas. Prieš naudojant bandymo substratas turi būti vėdinamas. Išgaravusio vandens kiekis turi būti papildytas. Kontroliniame bandinyje turi būti toks pat kiekvieno naudoto priedo kiekis.

Jei bandomoji medžiaga netirpsta ir negali būti disperguota ar emulguota organiniuose tirpikliuose, 10 g smulkaus malto kvarco ir bandomosios medžiagos, kiek jos reikia 500 g sauso dirbtinio dirvožemio apdoroti, mišinys maišomas su 490 g sauso bandomojo substrato.

Kiekvienai bandymų partijai į stiklinį indą dedama šlapio bandymo substrato, atitinkančio 500 g sauso substrato, ir ant bandymo substrato viršaus dedama 10 sliekų, kurie prieš tai 24 valandas buvo laikomi panašiam šlapiame pagrindiniame substrate, po to greitai nuplauti vandeniu, vandens perteklių sugeriant filtriniu popieriumi.

Indai uždengiami perforuotu plastikiniu dangčiu, lėkštele ar plėvele, kad substratas nedžiūtų, ir 14 parų laikomi bandymo sąlygomis.

Vertinimas turi būti atliekamas po 14 parų (ir pasirinktinai po septynių parų) nuo bandymo pradžios. Substratas paskleidžiamas ant stiklinės ar nerūdijančio plieno plokštės. Sliekai apžiūrimi ir nustatomas gyvųjų sliekų skaičius. Sliekai laikomi nugaišusiais, jei jie neatsako į švelnų mechaninį priekinio galo dirginimą.

Kai tikrinimas atliekamas po septynių parų, indas vėl užpildomas substratu, ir likę gyvi sliekai dedami ant to paties bandymo substrato viršaus.

### 1.6.4. Bandomieji organizmai

Bandomieji organizmai turi būti suaugę *Eisenia foetida* (žr. priedėlio pastabą) (bent dviejų mėnesių amžiaus su *clitellum*), drėgnų sliekų masė yra nuo 300 iki 600 mg. (Apie auginimo metodą žr. priedėlį.)

## 2. DUOMENYS

### 2.1. REZULTATŲ APDOROJIMAS IR VERTINIMAS

Ataskaitoje pateikiamos bandomosios medžiagos koncentracijos su nuoroda į atitinkamą procentinį kiekį nugaišusių sliekų.

Kai duomenys yra tinkami skaičiuoti, LC<sub>50</sub> vertė ir pasiklovimo ribos ( $p = 0,05$ ) turi būti nustatyti taikant standartinius metodus (Litchfield ir Wilcoxon, 1949, lygiaverčiam metodui). LC<sub>50</sub> turi būti nurodyta mg bandomosios medžiagos vienam kilogramui bandymo substrato (sausio).

Tais atvejais, kai koncentracijos kreivė yra per statį, kad būtų galima skaičiuoti LC<sub>50</sub>, pakanka grafino šios vertės įverčio.

Kai dvi gretimos koncentracijos, kurių santykis 1,8, duoda tik 0 % ir tik 100 % gaištamumą, šių dviejų verčių pakanka pažymėti intervalą, į kurį patenka LC<sub>50</sub>.

### 3. ATASKAITA

#### 3.1. BANDYMO ATASKAITA

Bandymo ataskaitoje pateikiama, jei įmanoma, tokia informacija:

- tvirtinimas, kad bandymas buvo atliekamas pagal aukščiau minėtus kokybės kriterijus,
- atliktas bandymas (intervalo nustatymo bandymas ir (ar) galutinis bandymas),
- tikslus bandymo sąlygų aprašymas arba patvirtinimas, kad bandymas buvo atliktas pagal metodą; turi būti nurodyti visi nukrypimai,
- tikslus aprašymas, kaip bandomoji medžiaga buvo įmaišyta į pagrindinį bandymo substratą,
- informacija apie bandomuosius organizmus (rūšis, amžius, masės vidutinė vertė ir intervalas, laikymo ir auginimo sąlygos, tiekėjas),
- metodas, taikytas nustatyti LC<sub>50</sub>,
- bandymo rezultatai, įskaitant visus naudotus duomenis,
- bandomųjų organizmų pastebėtų simptomų ar elgesio pokyčių aprašymas,
- gaištamumas kontroliniuose bandiniuose,
- LC<sub>50</sub> ar didžiausia bandyta koncentracija, kurioje gaištamumas nulinis, ir mažiausia bandyta koncentracija, kurioje gaištamumas 100 %, 14 parų (pasirinktinai septynios paros) nuo bandymo pradžios,
- koncentracijos ir atsako kreivės brėžinys,
- rezultatai, gauti su etalonine medžiaga, šiame bandyme ar iš ankstesniųjų kokybės kontrolės tyrimų.

### 4. NUORODOS

- 1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 207, Decision of the Council C(81)30 final.
- 2) Edwards, C. A. and Lofty],. R., 1977, Biology of Earthworms, Chapman and Hall, London, p. 331.
- 3) Bouche. M. B., 1972, Lombriciens de France, Ecologie et Systematique, Institut National de la Recherche Agronomique, p. 671.
- 4) Litchfield, J. T. 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.

## 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  $20 \pm 2$  °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 (reguluojama kalcio karbonatu), savitasis joninis laidis mažas (mažesnis nei 6 mohm ar druskos 0,5 % koncentracijos tirpalo).

Substratas turi būti drėgnas, bet ne per šlapias.

Be aukščiau pateikto metodo galima naudoti kitus sėkmingus būdus.

- Pastaba. Eisenia foetida* yra dviejų veislių, kurias kai kurie taksonomijos specialistai išskyrė į rūšis (Bouche, 1972). Šios veislės morfologiškai yra panašios, tačiau viena jų – *Eisenia foetida foetida* – ant segmentų turi tipiškus skersus dryžius ar juostas, o kita – *Eisenia foetida andrei* – to neturi ir yra margos rausvos spalvos. Jei įmanoma, turi būti naudojama *Eisenia foetida andrei*. Galima naudoti ir kitas rūšis, jei yra reikiamos metodikos.



## C.9. BIOLOGINIS SKAIDYMAS

## ZAHN-WELLENS BANDYMAS

## 1. METODAS

## 1.1. ĮVADAS

Metodo tikslas yra įvertinti vandenyje tirpių, nelakių organinių medžiagų galimą biologinį suskaidymą, kai jas statiniame bandyme veikia palyginti didelės koncentracijos mikroorganizmai.

Ant suspenduotų kietųjų dalelių gali vykti fizikocheminė adsorbicija, ir į tai turi būti atsižvelgta aiškinant rezultatus (žr. 3.2).

Bandomosios medžiagos naudojamos tokios koncentracijos, kad atitektų DOC vertės intervale nuo 50 iki 400 mg/litre ar COD vertės nuo 100 iki 1 000 mg/litre (DOC = ištirpusi organinė anglis; COD = cheminis deguonies suvartojimas). Šios palyginti didelės koncentracijos turi analizinio patikimumo pranašumą. Junginiai, kurie turi toksinių savybių, gali sulėtinti arba inhibuoti skaidymo procesą.

Bandomosios medžiagos biologiniam suskaidymui įvertinti šiame bandyme taikomas ištirpusios organinės anglies koncentracijos arba cheminio deguonies poreikio matavimas.

Lygiagrečiai taikant specifinį analizės metodą gali būti įmanoma įvertinti medžiagos pirminį biologinį skaidymą (pirminės cheminės sandaros išnykimas).

Metodas tinka tik toms organinėms bandomosioms medžiagoms, kurias bandyme naudojamomis koncentracijomis:

- tirpios vandenyje bandymo sąlygomis,
- garų slėgis bandymo sąlygomis yra labai mažas,
- neinhibuoja bakterijų,
- bandymo sistemoje adsorbuojamos tik ribotu laipsniu,
- iš bandomojo tirpalo nepradingsta dėl putojimo.

Norint paaiškinti gautus rezultatus, ypač kai rezultatai yra žemi arba ribiniai, naudinga būtų turėti informacijos apie bandomosios medžiagos pagrindinių komponentų santykinę dalį.

Kai reikia paaiškinti žemus rezultatus ir pasirinkti tinkamas bandomąsias koncentracijas, pageidautina turėti informacijos apie medžiagos toksiškumą mikroorganizmams.

## 1.2. APIBRĖŽTYS IR VIENETAI

Bandymo pabaigoje pasiektas skaidymo lygis ataskaitoje pateikiamas kaip „Biologinis skaidumas Zahn-Wellens bandyme“:

$$D_T(\%) = \left[ 1 - \left( \frac{C_T - C_B}{C_A - C_{BA}} \right) \right] \times 100$$

čia:

$D_T$  = biologinis skaidymas (%) laiku T,

$C_A$  = DOC (ar COD) vertės bandomajame mišinyje po trijų valandų nuo bandymo pradžios (mg/l) (DOC = ištirpusi organinė anglis, COD = cheminis deguonies suvartojimas),

$C_T$  = DOC ar COD vertės bandomajame mišinyje bandinio ėmimo metu (mg/l),

$C_B$  = DOC ar COD vertė tuščiajame bandinyje bandinio ėmimo metu (mg/l),

$C_{BA}$  = DOC ar COD vertė tuščiajame bandinyje, išmatuota po trijų valandų nuo bandymo pradžios (mg/l).

Skaidymo laipsnis apvalinamas iki artimiausio sveikojo procentų skaičiaus.

Skaidymo procentinė vertė nurodoma kaip bandomosios medžiagos DOC (ar COD) pašalinimo procentinė vertė.

Skaidymo vertės, išmatuotos po trijų valandų, ir apskaičiuotos, bet geriau išmatuotos, pradinės vertės skirtumas gali suteikti naudingos informacijos apie medžiagos šalinimą (žr. 3.2. Rezultatų aiškinimas).

### 1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Kai kuriais atvejais, kai tiriamos naujos medžiagos, etaloninės medžiagos gali būti naudingos, tačiau specifinės etaloninės medžiagos vis dar negali būti rekomenduotos.

### 1.4. BANDYMO METODO PRINCIPAS

Aktyvusis dumblas, mineralinė mitybinė terpė ir bandomoji medžiaga, kaip vienintelis anglies šaltinis vandeniame tirpale, dedami kartu į vieno–keturių litrų tūrio stiklinį indą su maišikliu ir aeratoriumi. Mišinys ne ilgiau kaip 28 paras maišomas ir aeruojamas 20–25 °C temperatūroje išsklaidytoje šviesoje arba tamsioje patalpoje. Skaidymo procesas kontroliuojamas nustatant DOC (ar COD) vertes filtruotame tirpale kasdien ar kitokiais reguliariais tinkamais laiko tarpais. Po kiekvieno matavimo nustatytos DOC (ar COD) pašalinimo vertės ir vertės, gautos po trijų valandų nuo bandymo pradžios, santykis reiškiamas procentine biologinio skaidymo verte ir yra naudojamas kaip tam momentui nustatytas skaidymo laipsnio matas. Rezultatas brėžiamas kaip kitimas laike ir gaunama biologinio skaidymo kreivė.

Kai taikomas specifinis analizės metodas, galima nustatyti pradinės medžiagos koncentracijos pokyčius dėl jos molekulių biologinio skaidymo (pirminis biologinis skaidumas).

### 1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

Tarplaboratorinio lyginimo bandymas parodė, kad šio metodo atkuriamumas yra tinkamas.

Metodo jautrumas labai priklauso nuo tuščiojo bandinio kintamumo ir, kiek mažiau, nuo ištirpusios organinės anglies nustatymo preciziškumo ir bandomosios medžiagos kiekio skystyje.

### 1.6. BANDYMO METODIKOS APRAŠYMAS

#### 1.6.1. Pasirengimas

##### 1.6.1.1. Reagentai

Bandymo vanduo – geriamasis vanduo, kuriame organinės anglies kiekis < 5 mg/litre. Bendra kalcio ir magnio jonų koncentracija neturi būti didesnė kaip 2,7 mmol/litre; priešingu atveju, reikia atitinkamai skiesti dejonizuotu arba distiliuotu vandeniu.

Sieros rūgštis, analizinis reagentas (A.R.):	50 g/l
Natrio hidroksido tirpalas A.R.:	40 g/l
Mineralinis mitybinis tirpalas: viename litre dejonizuoto vandens ištirpinkite:	
amonio chlorido, NH <sub>4</sub> Cl, A.R.:	38,5 g
natrio dihidrofosfato, NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·x2H <sub>2</sub> O, A.R.:	33,4 g,
kalio dihidrofosfato, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , A.R.:	8,5 g,
dikalio monohidrofosfato, K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 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.

Membraninio filtravimo aparatas.

Membraniniai filtrai, akučių dydis 0,45 µm. Membraniniai filtrai tinka, jei užtikrinama, kad filtravimo pakopoje jie neišskiria anglies ir nesugeria medžiagos.

Analizės įranga organinės anglies kiekiui ir cheminiam deguonies suvartojimui nustatyti.

#### 1.6.1.3. Sėjimo kultūros ruošimas

Aktyvusis dumblas iš biologinio valymo įrenginio yra plaunamas (kelis kartus), centrifuguojant arba nusodinant iš bandymo vandens (žr. anksčiau).

Aktyvusis dumblas turi būti atitinkamos būsenos. Tokio dumblo yra tinkamai veikiančiame nuotekų valymo įrenginyje. Norint gauti kiek įmanoma daugiau įvairių bakterijų rūšių ar štamų, gali būti geriau maišyti skirtingų šaltinių sėjimo kultūras (pvz., skirtingų valymo įrenginių, dirvožemio ekstraktų, upės vandens ir t. t.). Mišinys turi būti apdorojamas, kaip aprašyta anksčiau.

Kaip tikrinti aktyviojo dumblo aktyvumą, žr. „Veikimo tikrinimas“, toliau.

#### 1.6.1.4. Bandomųjų tirpalų ruošimas

Į bandymo indą įpilkite 500 ml bandymo vandens, 2,5 ml/litre mineralinio mitybinio tirpalo ir tiek aktyviojo dumblo, kad galutiniame mišinyje sausosios medžiagos būtų nuo 0,2 iki 1,0 g/litre. Įpilkite pakankamą kiekį pradinio bandomosios medžiagos tirpalo, kad DOC koncentracija galutiniame mišinyje būtų nuo 50 iki 400 mg/litre. Atitinkamos COD vertės yra nuo 100 iki 1 000 mg/litre. Praskieskite bandymo vandeniu iki bendrojo tūrio nuo vieno iki keturių litrų. Tai, kokį bendrąjį tūrį pasirinkti, priklauso nuo bandinių skaičiaus, kurie bus imami DOC ar COD nustatyti, ir nuo analizės metodikai reikalingo tūrio.

Paprastai galima laikyti, kad pakanka dviejų litrų tūrio. Kiekvienai bandymų serijai lygiagrečiai ruošiamas bent vienas kontrolinis indas (su tuščiuoju bandiniu); jame yra tik aktyviojo dumblo ir mineralinio mitybinio tirpalo, praskiestų bandymo vandeniu iki to paties tūrio, kaip ir induose su bandomąja medžiaga.

#### 1.6.2. Bandymo procedūra

Išsklaidytoje šviesoje ar tamsioje patalpoje 20–25 °C temperatūroje laikomų bandymo indų turinys maišomas magnetinėmis maišyklėmis ar sraigtiniais maišytuvais. Aeruojama suslėgtuoju oru, valomu leidžiant per medvilnės filtrą ir, jei būtina, per plovimo kolbą. Reikia užtikrinti, kad dumblas nenusistovėtų, o deguonies koncentracija būtų ne mažesnė kaip 2 mg/litre.

pH vertė turi būti tikrinama vienodais laiko tarpais (pvz., kasdien) ir, jei būtina, nustatoma 7–8 pH vertė.

Garavimo nuostoliai reikiamais kiekiais kompensuojami dejonizuotu ar distiliuotu vandeniu prieš pat kiekvieną bandinio ėmimą. Gerai būtų pažymėti skysčio lygį ant indo sienelės prieš bandymo pradžią. Naujos žymės daromos po kiekvieno bandinio ėmimo (neaeuojant ir nemaišant). Norint aptikti bandomosios medžiagos adsorbciją aktyviuoju dumbliu, pirmieji bandiniai visuomet imami po trijų valandų nuo bandymo pradžios.

Bandomosios medžiagos šalinimas sekamas, darant kasdien ar kitais vienodais laiko tarpais DOC ar COD nustatymą. Bandiniai iš bandymo ir tuščiojo bandymo indų filtruojami per kruopščiai išplautą popieriaus filtrą. Pirmieji bandomojo tirpalo filtrato 5 ml išpilami. Sunkiai filtruojamas dumblas gali būtį prieš tai

pašalintas 10 minučių centrifugavimu. DOC ir COD nustatymas daromas bent po du kartus. Bandymo trukmė ne daugiau kaip 28 paros.

*Pastaba.* Jei bandiniai lieka drumsti, jie filtruojami per membraninius filtrus. Membraniniai filtrai neturi išskirti ar adsorbuoti jokių organinių medžiagų.

#### Aktyviojo dumblo veikimo tikrinimas

Norint patikrinti funkcinę aktyviojo dumblo gebą, lygiagrečiai kiekvienai bandymų serijai turi būti atliekamas bandymas su žinoma medžiaga. Buvo nustatyta, kad šiam tikslui tinka dietilenglikolis.

#### Adaptavimas

Jei analizė atliekama palyginti dažnai (pvz., kasdien), adaptavimą galima aiškiai atpažinti iš skaidymo kreivės (žr. 2 paveikslą). Todėl bandymas neturi būti pradėdamas prieš pat savaitgalį.

Jei adaptavimas įvyksta laikotarpio pabaigoje, bandymą galima pratęsti, kol skaidymas bus baigtas.

*Pastaba.* Jei reikia daugiau žinių apie adaptuoto dumblo elgseną, tas pats aktyvusis dumblas dar kartą naudojamas su ta pačia bandomąja medžiaga pagal tokią metodiką:

Išjunkite maišytuvą ir aeratorių ir leiskite dumblui nusistovėti. Skystį virš dumblo nusiurbkite, įpilkite ne daugiau kaip du litrus bandymo vandens, 15 minučių maišykite ir leiskite vėl nusistovėti. Skystį virš dumblo nusiurbkite dar kartą, likusį dumblą naudokite bandymui su ta pačia medžiaga pagal 1.6.1.4 ir 1.6.2 pakartoti. Vietoj nusodinimo, aktyvųjį dumblą galima atskirti centrifugavimu.

Adaptuotas dumblas gali būti sumaišomas su šviežiu dumblu, kad sausos medžiagos koncentracija būtų nuo 0,2 iki 1 g/litre.

#### Analizės priemonės

Paprastai bandiniai filtruojami per kruopščiai išplautą filtrinį popierių (plaukite dejonizuotu vandeniu).

Bandiniai, kurie lieka drumsti, filtruojami per membraninį filtrą (0,45 µm).

DOC koncentracija bandinių filtratuose (pirmieji 5 ml išpilami) nustatoma du kartus naudojant TOC nustatymo aparatūrą. Jei filtrato negalima analizuoti tą pačią dieną, iki kitos dienos jis turi būti laikomas šaldytuve. Ilgiau laikyti nerekomenduojama.

COD koncentracija bandinio filtratuose nustatoma su COD analizės įranga, taikant toliau 2 nuorodoje aprašytą metodiką.

## 2. DUOMENYS IR VERTINIMAS

DOC ir (ar) COD koncentracija bandiniuose, gautuose pagal 1.6.2, nustatoma bent po du kartus. Skaidymas laiku T apskaičiuojamas pagal formulę (su apibrėžtimis), pateiktą 1.2 aukščiau.

Skaidymo laipsnis apvalinamas iki artimiausio sveiką procentų skaičiaus. Bandymo pabaigoje pasiekto skaidymo vertė ataskaitoje pateikiama kaip „Biologinis skaidumas Zahn-Wellens bandyme“.

*Pastaba.* Jei medžiaga visiškai suskaidoma dar nesibaigus bandymo laikui ir rezultatą patvirtina kitą dieną atlikta dar viena analizė, bandymą galima baigti.

### 3. ATASKAITA

#### 3.1. BANDYMO ATASKAITA

Bandymo ataskaitoje pateikiama, jei įmanoma, tokia informacija:

- pradinė medžiagos koncentracija,
- visa kita informacija ir bandymų rezultatai, susiję su bandomąja medžiaga, etalonine medžiaga, jei buvo naudota, ir tuščiuoju bandymu,
- koncentracija po trijų valandų,
- biologinio skaidymo kreivė su aprašymu,
- data ir vieta, iš kurios buvo imti bandomieji organizmai, adaptavimo būseną, naudota koncentracija ir t. t.,
- mokslinis bet kokių bandymo metodikos keitimų pagrindimas.

#### 3.2. DUOMENŲ AIŠKINIMAS

Dienas ar savaites vykstantis laipsniškas DOC (COD) šalinimas rodo, kad medžiaga biologiškai skaidoma.

Tačiau kai kuriais atvejais reikšmės gali turėti fizikocheminė adsorbicija, ir tai matyti, kai nuo bandymo pradžios per pirmąsias tris valandas vyksta dalinis ar visiškas pašalinimas, o kontrolinio ir bandomojo skysčių virš dumblo skirtumas išlieka netikėtai mažas.

Jei reikia atskirti biologinį skaidymą (ar dalinį biologinį skaidymą) ir adsorbiciją, būtina atlikti tolesnius bandymus.

Tai galima daryti įvairiais būdais, tačiau įtikinamiausias būdas yra pamatiniame bandyme (geriau, kad tai būtų respirometrinis bandymas) kaip sėjimo kultūrą naudoti skystį virš dumblo ar dumblą.

Bandomosios medžiagos, kurių neadsorbicinis DOC (COD) šalinimo vertės bandyme yra didelės, turi būti laikomos potencialiai biologiškai skaidomomis. Dalinis neadsorbicinis šalinimas rodo, kad cheminė medžiaga bent kažkiek yra biologiškai skaidoma. Mažos ar nulinės DOC (COD) šalinimo vertės gali būti dėl mikroorganizmų inhibavimo bandomąja medžiaga, tai dar gali parodyti dumblo irimas ir jo kiekio mažėjimas, dėl ko skystis virš dumblo drumsčiasi. Bandymas turi būti pakartotas naudojant mažesnę bandomosios medžiagos koncentraciją.

Naudojant specifinį junginio analizės metodą ar bandomąsias medžiagas su žymėtais  $^{14}\text{C}$  atomais, gali būti pasiektas didesnis jautrumas. Jei bandomasis junginys turi  $^{14}\text{C}$ ,  $^{14}\text{CO}_2$  surinkimas patvirtintų, kad biologinis skaidymas įvyko.

Kai duomenys pateikiami kaip pirminio biologinio skaidymo rezultatai, turi būti paaiškinta, jei tai įmanoma, kaip pakito cheminė sandara, kad neliko pradinės bandomosios medžiagos atsako.

Turi būti pateiktas analizės metodo tinkamumo patvirtinimas ir tuščiojo bandinio terpėje nustatyta skaidymo vertė.

### 4. NUORODOS

- 1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 302 B, Decision of the Council C(81) 30 final.
- 2) Annex V C.9 Degradation: Chemical Oxygen Demand, Commission Directive 84/449/EEC (OL L 251, 1984 9 19, p. 1).

## Priedėlis

## VERTINIMO PAVYZDYS

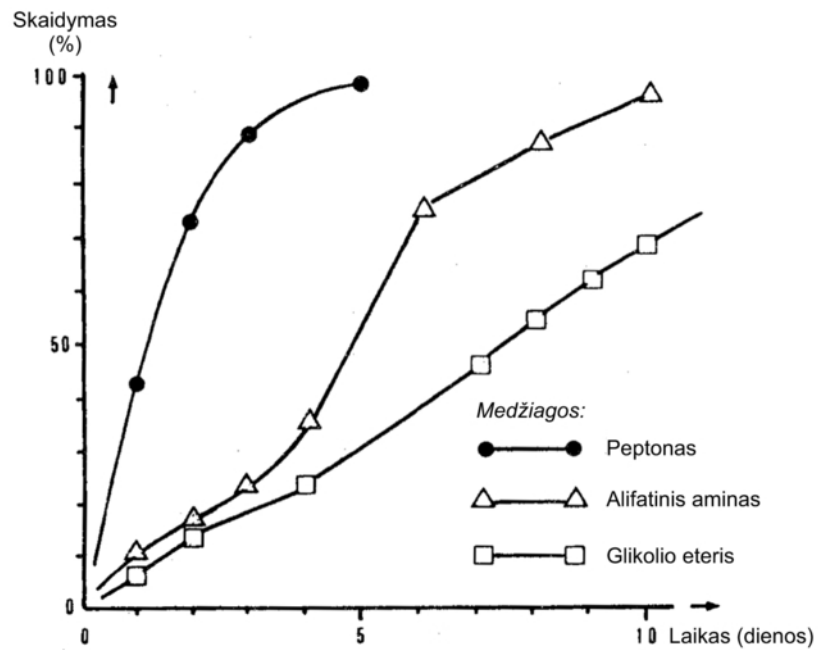
Organinis junginys:	4-Etoksibenzoinė rūgštis
Teorinė bandomoji koncentracija:	600 mg/l
Teorinis DOC kiekis:	390 mg/l
Sėjimo kultūra	Nuotekų valymo įrenginys...
Koncentracija:	1 gramas sausos medžiagos/litre
Adaptavimo būseną:	Neadaptuotas
Analizė:	DOC nustatymas
Bandinio kiekis:	3 ml
Kontrolinė medžiaga:	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 <sup>(1)</sup> mg/l	DOC <sup>(1)</sup> mg/l	DOC grynas kiekis mg/l	Skaidymas %	DOC <sup>(1)</sup> mg/l	DOC grynas kiekis mg/l	Skaidymas %
0	—	—	300,0	—	—	390,0	—
3 valandos	4,0	298,0	294,0	2	371,6	367,6	6
1 para	6,1	288,3	282,2	6	373,3	367,2	6
2 paros	5,0	281,2	276,2	8	360,0	355,0	9
5 paros	6,3	270,5	264,2	12	193,8	187,5	52
6 paros	7,4	253,3	245,9	18	143,9	136,5	65
7 paros	11,3	212,5	201,2	33	104,5	93,2	76
8 paros	7,8	142,5	134,7	55	58,9	51,1	87
9 paros	7,0	35,0	28,0	91	18,1	11,1	97
10 parų	18,0	37,0	19,0	94	20,0	2,0	99

<sup>(1)</sup> Trijų matavimų vidutinė vertė.

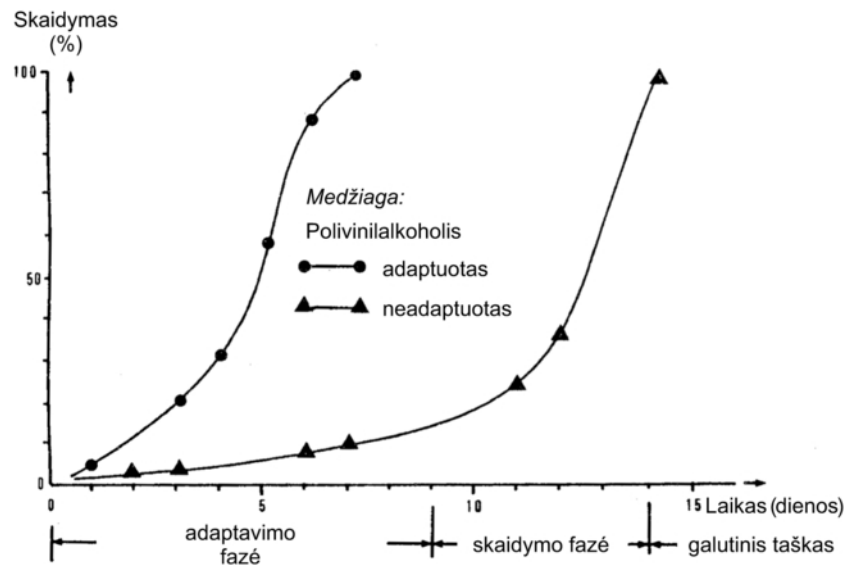
1 paveikslas

## Biologinio skaidymo kreivių pavyzdžiai



2 paveikslas

## Dumblo adaptavimo pavyzdžiai



## C.10. BIOLOGINIS SKAIDYMAS

## AKTYVIOJO DUMBLO MODELIAVIMO BANDYMAS

## 1. BANDYMO METODAS

## 1.1. ĮVADAS

## 1.1.1. Bendrosios pastabos

Metodas taikytinas tik toms organinėms medžiagoms, kurios bandyme naudojamomis koncentracijomis:

- vandenyje yra tirpios tiek, kiek reikia bandomiesiems tirpalams ruošti,
- garų slėgis bandymo sąlygomis yra labai mažas,
- neinhibuoja bakterijų.

Norint paaiškinti gautus rezultatus, ypač kai rezultatai yra žemi arba ribiniai, naudinga būtų turėti informacijos apie bandomosios medžiagos pagrindinių komponentų santykinę dalį.

Kai reikia paaiškinti žemus rezultatus ir pasirinkti tinkamas bandomąsias koncentracijas, pageidautina turėti informacijos apie medžiagos toksiškumą mikroorganizmams.

## 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 > 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 suvartojimas).

Turi būti nustatytas organinės anglies kiekis tiriamojoje medžiagoje (ar cheminis deguonies suvartojimas).

## 1.1.3. Pirminio biologinio skaidumo nustatymas (specifinė analizė)

Metodo tikslas yra nustatyti pirminį medžiagos biologinį skaidumą aktyviojo dumblo įrenginio modelyje, taikant specifinį analizės metodą, kai medžiagos koncentracija yra apie 20 mg/litre (galima naudoti didesnę ar mažesnę koncentraciją, jei tai leidžia analizės metodas ir medžiagos toksiškumas). Tai leidžia įvertinti medžiagos pirminį biologinį skaidumą (pirminės cheminės sandaros išnykimą).

Šio metodo tikslas nėra nustatyti bandomosios medžiagos mineralizavimą.

Būtina turėti atitinkamą analizės metodą bandomajai medžiagai nustatyti.

## 1.2. APIBRĖŽTYS IR VIENETAI

## 1.2.1. DOC/COD analizė

Medžiagos šalinimo laipsnis reiškiamas lygtimi:

$$TD = \frac{(T - (E - E_0))}{(T)} \times 100 \% \quad [1(a)]$$

kai:

DR = bandomosios medžiagos šalinimo laipsnis procentais DOC (ar COD) per duotą vidutinę sulaikymo trukmę,

T = bandomosios medžiagos koncentracija intake, mg DOC/litre (ar mg COD/litre),



- E = DOC (ar COD) koncentracija bandymo įrenginio ištakyje, mg DOC/litre (ar mg COD/litre),  
 E<sub>o</sub> = 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<sub>w</sub>) per duotą vidutinę sulaikymo trukmę skaičiuojama pagal lygtį:

$$R_w = \frac{(C_i - C_o)}{C_i} \times 100 \% \quad [1(b)]$$

čia:

- C<sub>i</sub> = medžiagos koncentracija bandymo įrenginio intake (medžiagos kiekis mg/litre, nustatant specifinės analizės metodu),  
 C<sub>o</sub> = 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. BANDYMO METODO PRINCIPAS

Biologiniam suskaidomumui nustatyti lygiagrečiai atliekami bandymai dviejuose eksperimentiniuose aktyviojo dumblo įrenginiuose (OECD patvirtinamasis bandymas ar akytojo indo įrenginiai). Bandomoji medžiaga dedama į vieno iš įrenginių (sintetinių ar buitinių nuotekų) intake, tuo tarpu į antrąjį įrenginį tiekiamos tik nuotekos. Pirminiam biologiniam skaidymui nustatyti atliekant specifinę medžiagos analizę intake ir ištakyje, naudojamas tik vienas įrenginys.

DOC (ar COD) koncentracijos matuojamos ištakiuose, arba medžiagos koncentracija nustatoma atliekant 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 nesuskaidytai bandomajai medžiagai.

Kai atliekama 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 ribotumo.

## 1.6. BANDYMO METODO APRAŠYMAS

## 1.6.1. Pasirengimas

## 1.6.1.1. Aparatūra

Reikia dviejų to paties tipo įrenginių, išskyrus tą atvejį, kai atliekama specifinė analizė. Gali būti naudojami dviejų tipų įrenginiai.

OECD patvirtinamasis bandymas

Įrangą (1 priedėlis) sudaro indas sintetinėms nuotekoms laikyti (A), dozavimo siurblys (B), aeravimo indas (C), nusodintuvas (D), aeroliftinis 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 nuolatinių sintetinių nuotekų srautą į aeravimo indą; galima naudoti bet kurią tinkamą sistemą, svarbu, kad būtų užtikrintas tiekimo srautas ir koncentracija. Normalaus veikimo 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.

Aeroliftinis siurblys E reguliuojamas taip, kad aktyvusis dumblas iš nusodintuvo tolygiai ir nuolat būtų grąžinamas į aeravimo indą C.

„Akytasis indas“

Akytasis 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 priedėlio 1 ir 2 paveikslai). Akytas indas dedamas į iš tinkamo plastiko pagamintą 15 cm skersmens nepralaidų indą, cilindrinėje dalyje 17,2 cm aukštyje turinčiame išleidžiamąją angą, kuri nustato skysčio tūrį inde (3 litrai). Vidinio indo viršutinė dalis apjuosta standžiu laikančiuoju žiedu iš tinkamo plastiko taip, kad tarp vidinio ir išorinio indų būtų ištakiui skirta 0,5 cm erdvė.

Akytąjį indą galima įtaisyti ant termostatuojamos vandens vonios dugno. Į 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 nuolatinių sintetinių nuotekų srautą į aeravimo indą; galima naudoti bet kurią tinkamą sistemą, svarbu, kad būtų užtikrintas tiekimo srautas ir koncentracija.

Reikia turėti atsarginius vidinius aktyuosius indus, kad būtų galima pakeisti bet kurį užkimštą indą; užkimšti indai 24 valandas plaunami hipochlorito tirpale, po to gerai išplaunami vandentiekio vandeniui.

## 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 <sub>2</sub> x2H <sub>2</sub> O:	4 mg,
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O:	2 mg,
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> :	28 mg.

#### Buitinės nuotekos

Buitinės nuotekos turi būti kasdien 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 siurbliu 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 aktyvųjų dumblą.

Galima naudoti įvairias sėjimo kultūras.

Pateikiami trys sėjimo kultūros pavyzdžiai:

##### a) sėjimo kultūra iš antrinio ištakio

Sėjimo kultūra turi būti gauta iš geros kokybės antrinio ištakio, renkant ją valymo įrenginyje, į kurią 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 išpilami. 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, nesterilau) suspenduojama 1 000 ml geriamojo chloro neturintčio vandens. (Netinka dirvožemiai, kurių didelė dalis yra molis, smėlis ar juodžemis). Po sumaišymo suspensija 30 minučių paliekama nusistovėti. Skystis virš nuosėdų filtruojamas per stambų filtrinį popierių, pirmuosius 200 ml išpilant. 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 mezosaprobino paviršinio vandens bandinį. Bandinys filtruojamas per stambų filtrinį popierių, pirmuosius 200 ml išpilant. 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 rezervuaro.

1.6.2. *Bandymo procedūra*

Bandymas atliekamas kambario temperatūroje; pastaroji turi būti nuo 18 iki 25 °C.

Jei tinka, bandymą galima atlikti mažesnėje temperatūroje (ne žemesnėje kaip 10 °C); jei medžiaga tokioje temperatūroje suiro, paprastai daugiau nereikia nieko daryti. Tačiau, jei medžiaga nesuiro, bandymas turi būti atliekamas pastovioje temperatūroje nuo 18 iki 25 °C.

1.6.2.1. Pasirengimo 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.

Pasirengimo laikotarpis tęsiasi nuo to momento, kai bandomoji medžiaga buvo įdėta pirmą kartą, iki tol, kol šalinimas pasiekia lygiagrečiąją kreivės dalį (palyginti pastovią vertę). Šio laikotarpio trukmė turi būti ne ilgesnė kaip šešios savaitės.

Vertinimo laikotarpis trunka tris savaites nuo to laiko, kai bandomosios medžiagos šalinimas pasiekia palyginti pastovią ir, paprastai didelę, vertę. Tų medžiagų, 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 trimis 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, (ir, OECD patvirtinamojo bandymo įrenginių atveju, 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, jo tankį galima padidinti 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 kruopščiai 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 suvartojimas (COD) ar ištirpusi organinė anglis (DOC), tai daroma ir intako filtrate (naudojama membrana, kurios akučių dydis 0,45 µm, pirmieji 20 ml (maždaug) filtrato išpilami).

COD ar DOC mažėjimas turi išsilyginti, kai gaunamos 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 kasdien išpilama 500 ml nuotekų ir aktyviojo dumblo mišinio, kad vidutinė dumblo sulaukymo trukmė būtų šešios paros.

Kai išmatuoti ir įvertinti dviejų įrenginių parametrai ((proceso veiksmingumas (COD ar DOC šalinimas), dumblo koncentracija, dumblo nusodinamumas, išstakių 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. Bandyimo procedūra

Palaikomos pradinio 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 kasdien ar naudojant atskirą pumpavimo įrenginį. Šią koncentraciją galima pasiekti laipsniškai. Jei bandomosios medžiagos toksinio poveikio aktyviajam dumbliui nenustatyta, galima bandyti didesnes koncentracijas.

Į tuščiojo bandymo įrenginį tiekiamas tik intakas, nededant medžiagos. Analizei imami išstakių atitinkamo tūrio bandiniai, kurie filtruojami per membraninį filtrą (0,45 µm), pirmuosius 20 ml (maždaug) filtrato išpilant.

Filtruoti bandiniai turi būti analizuojami tą pačią dieną, priešingu atveju jie turi būti konservuojami koku nors tinkamu būdu, pvz., į 10 ml filtrato įpilti 0,05 ml 1 % gyvsidabrio (II) chlorido (HgCl<sub>2</sub>) tirpalo ar laikyti bandinius 2–4 °C temperatūroje, jei laikoma ne ilgiau kaip 24 valandas, ar žemesnėje nei –18 °C temperatūroje, jei ilgesnį laiką.

Pradinis laikotarpis, pridėdam 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 įrenginio į kitą. Jei bandomosios medžiagos yra labai absorbuojančios, iš nusodintuvų siurbiamo po 1,5 litro skysčio virš dumblo ir supilama į kito įrenginio aktyviojo dumblo indą.

#### 1.6.2.3. Analizė

Norint sekti medžiagos elgseną, galima atlikti dviejų rūšių analizę:

DOC ir COD

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 atliekama ant dumblo adsorbuotos medžiagos specifinė analizė.

## 2. DUOMENYS IR VERTINIMAS

### 2.1. SUDVEJINTŲ ĮRENGINIŲ REŽIMAS

Naudojant „sudvejintų įrenginių režimą“, kasdienis šalinimo laipsnis, DR skaičiuojamas pagal 1.2.1.

Šios kasdienio šalinimo laipsnių DR vertės perskaičiuojamos į DRc vertes atsižvelgiant į medžiagos pernešimą transinokuliavimo procese, taikant [2] lygtį trijų valandų ar [3] lygtį šešių valandų vidutinei sulaikymo trukmei.

$$DRc = \left( \left( \frac{(4)}{(3)} \right) DR - \left( \frac{(100)}{(3)} \right) \right) \quad [2]$$

$$DRc = \left( \left( \frac{(8)}{(7)} \right) DR - \left( \frac{(100)}{(7)} \right) \right) \quad [3]$$

Skaiciuojama DRc verčių sekos vidutinė vertė ir papildomai pagal [4] lygtį skaičiuojamas standartinis nuokrypis

$$S_{DRc} = \left( \sqrt{\left( \frac{\left( \sum_{i=1}^n (DRc - DRc_i)^2 \right)}{(n-1)} \right)} \right) \quad [4]$$

čia:

$S_{DRc}$  = DRc verčių sekos standartinis nuokrypi,

$\overline{DRc}$  = DRc vidutinė vertė,

n = nustatymų skaičius.

DRc sekos išskirtys (*outliers*) eliminuojamos naudojant atitinkamą statistinę metodiką, pvz., Nalimov (6), 95 % tikimybės lygmeniui, ir DRc duomenų rinkinio be išskirčių vidutinė vertė ir standartinis nuokrypis skaičiuojami iš naujo.

Galutinis rezultatas skaičiuojamas pagal lygtį [5] kaip

$$DRc = \overline{DRc} \pm \left( \frac{t_{n-1; \alpha}}{\sqrt{n}} \right) (DRc) \quad [5]$$

čia:

$t_{n-1; \alpha}$  = iš lentelės paimta t vertė n skaičiui E ir  $E_o$  verčių porų ir statistinis pasiklivimo lygmuo P ( $P = 1 - \alpha$ ), kai P – 95 % (1).

Rezultatas pateikiamas, nurodant vidutinę vertę su nuokrypio ribomis 95 % tikimybės 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:

$$\text{COD ar DOC šalinimo procentinė vertė} = \left( \frac{(\text{nuotekų COD ar DOC} - \text{ištakio COD ar DOC})}{(\text{nuotekų COD ar DOC})} \right) \times 100$$

Šios kasdienio šalinimo vertės gali būti pavaizduotos 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.

Skačiuojama DR verčių sekos vidutinė vertė; papildomai skaičiuojamas standartinis nuokrypis pagal:

$$S_{DR} = \sqrt{\left( \frac{\left( \sum_{i=1}^n (\overline{DR} - DR_i)^2 \right)}{(n-1)} \right)} \quad [6]$$

čia:

$$\begin{aligned} S_{DR} &= DR_i \text{ verčių sekos standartinis nuokrypis,} \\ \overline{DR} &= DR_i \text{ vidutinė vertė,} \\ n &= \text{nustatymų skaičius.} \end{aligned}$$

DR sekos išskirtys eliminuojamos naudojant atitinkamą statistinę metodiką, pvz., Nalimov (6), 95 % tikimybės lygmeniui, ir iš naujo skaičiuojami DR rinkinio be išskirties vidutinė vertė ir standartinis nuokrypis.

Tuomet galutinis rezultatas skaičiuojamas pagal lygtį [7] kaip:

$$DR = \overline{DR} \pm \left( \frac{t_{n-1; \alpha}^s}{\sqrt{n}} \right) (DR) \quad [7]$$

čia:

$$t_{n-1; \alpha} = \text{iš lentelės paimta } t \text{ vertė } n \text{ skaičiui } E \text{ ir } E_0 \text{ verčių porų ir statistinis pasiklivimo lygmuo } P (P = 1 - \alpha), \text{ kai } P = 95 \% (1).$$

Rezultatas pateikiamas, nurodant vidutinę vertę su nuokrypio ribomis 95 % tikimybės lygmeniui, atitinkamą standartinį nuokrypį, DR duomenų skaičių rinkinyje, atmetus išskirtis, ir išskirčių skaičių, pvz.

$$\begin{aligned} DR &= (98,6 \pm 2,3) \% \text{ DOC šalinimo,} \\ s &= (4,65) \% \text{ DOC šalinimo,} \\ n &= 18 \\ x &= \text{išskirčių skaičius.} \end{aligned}$$

### 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. BANDYMO ATASKAITA

Bandymo ataskaitoje pateikiama, jei įmanoma, tokia informacija:

- 3 priedėlyje pateiktas blankas, kuriame nurodytos eksploataavimo sąlygos,
- pasirinkta aparatūra (OECD patvirtinamasis bandymas ar akytasis indas),
- 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 atliekama specifinė analizė,
- COD ar DOC šalinimo kitimo laike grafikas, įskaitant pradinį ir įvertinimo laikotarpį,

- bandomosios medžiagos pradiniam tirpale analizinis išgavimas COD ar DOC pavidalu,
- jei buvo atliktos specifinės analizės, bandomosios medžiagos šalinimo iš vandeninės terpės procentinės vertės kitimo laike grafikas (pradinis 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 stabilus veikimo laikotarpis,
- aktyviojo dumblo koncentracijos kitimo laike grafikas,
- visos pastabos apie aktyvųjį dumblą (perteklinio dumblo šalinimas, tūrio didėjimas, FeCl<sub>3</sub>, ir t. t.),
- 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 bandymo metodikos keitimų pagrindimas.

### 3.2. DUOMENŲ AIŠKINIMAS

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, atliekant dumblo analizę po atitinkamos desorbcijos.

Reikia toliau bandyti, jei reikia nustatyti 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

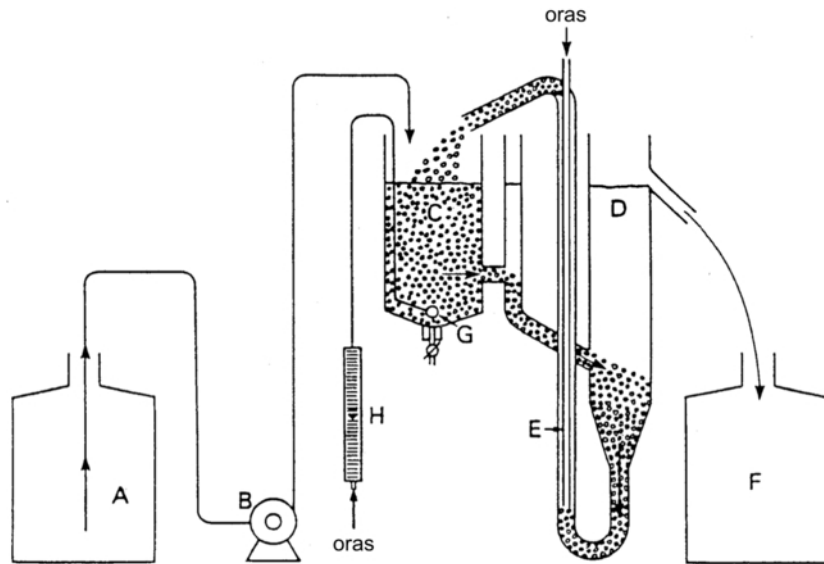
- 1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 303 A, Decision of the Council C(81) 30 final.
- 2) Annex V C9 Degradation Test -Chemical Oxygen Demand, Commission Directive 84/449/EEC (OL L 251, 1984 9 19, p. 1).



- 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.
- 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 Ausreißertests, insbesondere bei Ringversuchen zur Oberprufung analytisch-chemischer Untersuchungsmethoden, *Fresenius- Zeitschrift für Analytische Chemie*, 303 (1980), p. 406–408.

## 1 priedėlis

## 1 paveikslas



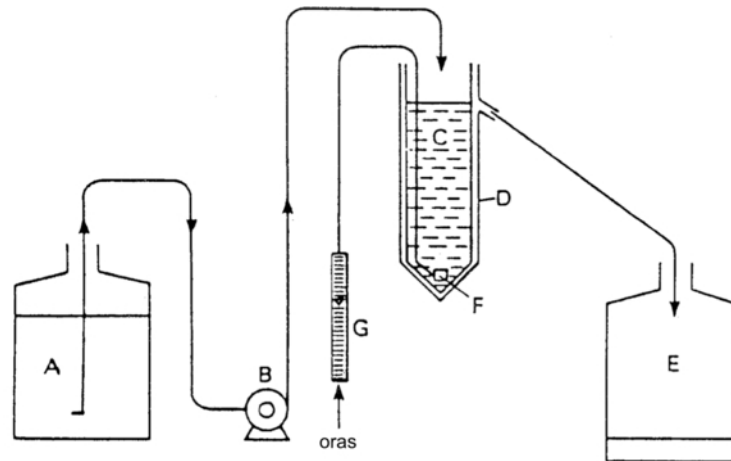
*Detalizavimas:* A = indas nuotekoms laikyti; E = aeroliftinis siurblys;  
B = dozavimo įtaisas; F = rinktuvas;  
C = aeravimo kamera (3 l talpos); G = aeratorius;  
D = nusodintuvas; H = oro debitmatis (neprivalomas).



## 2 priedėlis

## 1 paveikslas

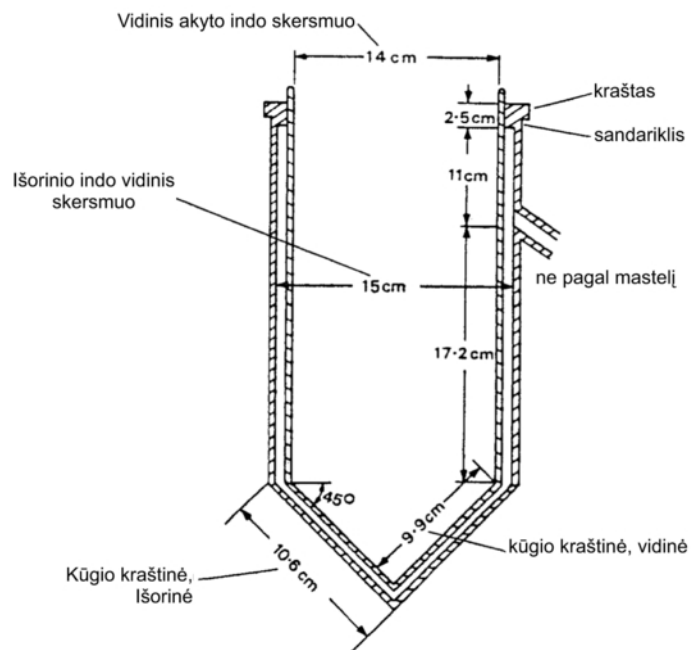
## Įranga, naudota įvertinti biologinį skaidumą



Detalizavimas: A: indas nuotekoms laikyti;  
 B: dozavimo siurblys;  
 C: akytas aeravimo indas;  
 D: išorinis indas su nelaidžiomis sienelėmis;  
 E: ištakio rinktuvas;  
 F: difuzinis aeratorius;  
 G: rotametas (neprivalomas).

## 2 paveikslas

## Trijų litrų talpos akyto indo tipo aeratoriaus duomenys



## 3 priedėlis

Veikimo sąlygos aktyviojo dumblo modeliavimo bandymui

**Pažymėti kiekvienoje grupėje***Aparatas*

OECD patvirtinimasis bandymas

Akytasis indas


*Veikimo būdas*

Vienas įrenginys

Sudvejinti įrenginiai

Nesudvejinti įrenginiai


*Persėjimas*

Nėra

Aktyvusis dumblas

Paviršinis sluoksnis


*Vidutinė sulaikymo trukmė*

Trys valandos

Šešios valandos


*Bazinė maitinamoji medžiaga*

Buitinės nuotekos

Sintetinės nuotekos


*Sėjimo kultūra*

Iš antrinio ištakio

Sudėtinė sėjimo kultūra

Iš aktyviojo dumblo


*Bandomosios medžiagos įdėjimas*

Nuo pradžios

Palaiapsniui

Po dumblo susidarymo


*Analizė*

Specifinė

COD

DOC


## C.11. BIOLOGINIS SKAIDYMAS

## AKTYVIOJO DUMBLO KVĖPAVIMO INHIBAVIMO BANDYMAS

## 1. METODAS

## 1.1. ĮVADAS

Aprašytas metodas įvertina bandomosios medžiagos poveikį mikroorganizmams, kai apibrėžtomis sąlygomis ir naudojant skirtingas bandomosios medžiagos koncentracijas matuojamas kvėpavimo intensyvumas.

Šio metodo tikslas yra duoti greitą atrankos metodą, kuriuo galima būtų identifikuoti medžiagas, galinčias neigiamai veikti aerobinius mikrobinio valymo įrenginius, ir nustatyti bandomųjų medžiagų koncentracijas, kurias naudojant nebūtų inhibavimo ir kurios būtų tinkamos naudoti biologinio skaidumo bandymuose.

Prieš galutinį bandymą gali būti atliekamas intervalo nustatymo bandymas. Jis suteikia informacijos apie koncentracijų, kurias reikia naudoti pagrindiniame bandyme, intervalą.

Į bandymo schemą įtraukti du kontroliniai bandymai be bandomosios medžiagos, vienas atliekamas bandymų serijos pradžioje, o kitas – pabaigoje. Be to kiekviena aktyviojo dumblo partija turi būti patikrinta naudojant etaloninę medžiagą.

Šį metodą lengviausia taikyti medžiagoms, kurios dėl jų tirpumo vandenyje ir mažo lakumo greičiausiai lieka vandenyje.

Medžiagoms, kurių tirpumas bandomojoje terpėje yra ribotas, gali būti neįmanoma nustatyti EC<sub>50</sub>.

Išvados, padarytos pagal rezultatus, kurie remiasi deguonies suvartojimu, gali būti klaidingos, kai bandomoji medžiaga turi polinkį atskirti oksidavimą ir fosforilinimą oksidacinio fosforilinimo procese.

Norint atlikti bandymą, naudinga turėti tokią informaciją:

- tirpumas vandenyje,
- garų slėgis,
- struktūrinė formulė,
- bandomosios medžiagos grynumas.

Patarimas

Aktyviajame dumble gali būti potencialiai patogeninių organizmų, todėl elgtis su juo reikia atsargiai.

## 1.2. APIBRĖŽTYS IR VIENETAI

Kvėpavimo intensyvumas yra nuotekų aerobiniame dumble esančių mikroorganizmų suvartojamo deguonies kiekis, paprastai reiškiamas mg O<sub>2</sub> vienam mg dumblo per valandą.

Norint skaičiuoti konkrečios koncentracijos bandomosios medžiagos inhibuojamąjį veikimą, kvėpavimo intensyvumas reiškiamas dviejų kontrolinių kvėpavimo intensyvumo verčių vidurkio procentine dalimi:

$$\left(1 - \left(\frac{2R_s}{(R_{c_1} + R_{c_2})}\right)\right) \times 100 = \text{inhibavimo procentinė vertė}$$

čia:

R<sub>s</sub> = deguonies suvartojimo intensyvumas bandant konkrečią bandomosios medžiagos koncentraciją,

$Rc_1$  = deguonies suvartojimo intensyvumas 1 kontroliniame bandyme,

$Rc_2$  = deguonies suvartojimo intensyvumas 2 kontroliniame bandyme.

$EC_{50}$  šiame metode yra bandomosios medžiagos koncentracija, kurią naudojant kvėpavimo intensyvumas sudaro 50 % kvėpavimo intensyvumo kontroliniame kvėpavimo bandyme šiame metode aprašytomis sąlygomis.

### 1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Rekomenduojama etalonine medžiaga naudoti 3,5-dichlorfenolį, kuris yra žinomas kvėpavimo inhibitorius, ir naudoti jį kaip priemonę patikrinti, ar dumblo jautrumas nėra nenormalus, nustatant medžiagos  $EC_{50}$  kiekvienai aktyviojo dumblo partijai.

### 1.4. BANDYMO METODO PRINCIPAS

Aktyvusis dumblas maitinamas standartiniame kiekyje mitybinės terpės, kurią sudaro sintetinės nuotekos, ir po 30 min ar 3 valandų sąlyčio, arba abiem atvejais, matuojamas dumblo kvėpavimo intensyvumas. Be to, dar matuojamas to paties aktyviojo dumblo kvėpavimo intensyvumas dedant įvairios koncentracijos bandomosios medžiagos, kai kitos sąlygos yra identiškos. Konkrečios koncentracijos bandomosios medžiagos inhibuojamasis veikimas išreiškiamas dviejuose kontroliniuose bandymuose gautų verčių vidurkio procentine dalimi. Pagal matavimus skirtingose koncentracijose apskaičiuojama  $EC_{50}$  vertė.

### 1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

Bandymo rezultatai tinkami, jei:

- kvėpavimo intensyvumo vertės abiejuose kontroliniuose bandymuose skiriasi ne daugiau kaip 15 %,
- 3,5-dichlorfenolio  $EC_{50}$  (30 minučių ir (ar) trijų valandų) yra priimtinaje intervale nuo 5 mg/litre iki 30 mg/litre.

### 1.6. BANDYMO METODO APRAŠYMAS

#### 1.6.1. Reagentai

##### 1.6.1.1. Bandomosios medžiagos tirpalai

Bandomosios medžiagos tirpalai ruošiami iš pradinio tirpalo prieš pat tyrimo pradžią. Jei daroma pagal toliau aprašytą rekomenduojamą metodiką, tinka 0,5 g/litre koncentracijos pradinis tirpalas.

##### 1.6.1.2. Kontroliniame bandyme naudojamos medžiagos tirpalas

3,5-dichlorfenolio tirpalą galima ruošti, pavyzdžiui, taip: tirpinkite 0,5 g 3,5-dichlorfenolio 10 ml 1 M NaOH, skieskite distiliuotu vandeniu maždaug iki 30 ml, pilkite maišydami 0,5 M  $H_2SO_4$ , kol pradeda kristi nuosėdos, tam maždaug reikia 8 ml 0,5 M  $H_2SO_4$ , ir galiausiai distiliuotu vandeniu skieskite mišinį iki vieno litro. pH vertė turi būti intervale nuo 7 iki 8.

##### 1.6.1.3. Sintetinės nuotekos

Sintetinių nuotekų mitybinė terpė 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  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ,

— 0,2 g  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ,

— 2,8 g  $K_2HPO_4$ .

*1 pastaba.* Šios sintetinės nuotekos yra koncentratas, kurio koncentracija 100 kartų didesnė nei nuotekų, aprašytų OECD techninėje ataskaitoje „Proposed method for the determination of the biodegradability of surfactants used in synthetic detergents“ (Siūlomas paviršinio aktyvumo medžiagų, naudojamų sintetiniuose plovikliuose, biologinio skaidumo nustatymo metodas) (1976 m. birželio 11 d.), į kurią pridėta dikalio hidrofosfato.

*2 pastaba.* Jei paruošta terpė naudojama ne iš karto, ji turi būti laikoma tamsoje nuo 0 iki 4 °C ir ne ilgiau, kaip vieną savaitę sąlygomis, kurios nekeistų nuotekų sudėties. Prieš dedant saugoti, terpę galima sterilizuoti, arba peptonas ir mėsos ekstraktas dedami prieš pat bandymo pradžią. Prieš naudojant, terpė turi būti gerai sumaišoma ir nustatoma jos pH vertė.

#### 1.6.2. Aparatūra

Matavimo aparatas, kurio tiksli konstrukcija nėra svarbi. Tačiau kolboje turi likti neužimtos erdvės, o zondas turi sandariai uždaryti matavimo kolbą.

Be įprastos laboratorijos įrangos dar reikalinga tokia speciali įranga:

- matavimo aparatas,
- aeravimo įtaisas,
- pH-elektrodas ir pH matavimo įranga,
- $O_2$  elektrodas.

#### 1.6.3. Sėjimo kultūros ruošimas

Bandymuose mikrobine sėjimo kultūra naudojamas aktyvusis dumblas iš valymo įrenginio, valančio daugiausia buitines nuotekas.

Jei būtina, grįžus į laboratoriją stambias daleles galima pašalinti, paliekant dumblą trumpą laiką, pvz., 15 minučių, nusistovėti, ir viršutinį smulkesnių dalelių sluoksnį dekantuoti ir toliau naudoti. Kitu būdu dumblą galima sumaišyti, kelioms sekundėms įjungus maišytuvą.

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 dumбло kiekis sveriamas ir džiovinamas. Remiantis šiuo rezultatu galima apskaičiuoti, kiek šlapio dumбло reikia suspenduoti vandenyje, kad gautame aktyviojo dumбло 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 dumбло, paruošto, kaip aprašyta aukščiau, įpilama 50 ml sintetinių nuotekų mitybinės terpės; ir mišinys per naktį aeruojamas  $20 \pm 2$  °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 dumбло ir nuotekų mišinio bandinyje turi būti nustatyta, kaip tai aprašyta ankstesnėje pastraipoje.

Jei ta pati dumбло partija turi būti naudojama kitomis dienomis (ne ilgiau kaip keturios paros), kiekvienos darbo dienos pabaigoje vienam litrui dumбло įpilama dar 50 ml sintetinių nuotekų mitybinės terpės.

#### 1.6.4. Bandymo procedūra

Trukmė/sąlyčio trukmė:	30 minučių ir (arba) trys valandos aeravimo sąlygomis
Vanduo	Geriamasis vanduo (prireikus dechloruotas)
Oro tiekimas	Švarus, be alyvos oras. Oro srautas nuo 0,5 iki 1 l/min.
Matavimo aparatūra	Plokščiadugnė kolba, pvz., BOD kolba



Deguonies matuoklis	Tinkamas deguonies elektrodas ir registravimo įrenginys
Mitybinis tirpalas	Sintetinės nuotekos (žr. aukščiau)
Bandomoji medžiaga	Bandomosios medžiagos tirpalas ruošiamas iš naujo bandymo pradžioje
Etaloninė medžiaga	pvz., 3,5-dichlorfenolis (bent trijų koncentracijų)
Kontroliniai bandymai	Sėjimo kultūros bandinys be bandomosios medžiagos
Temperatūra	20 ± 2 °C.

Toliau pateikiama siūloma eksperimento metodika, kurią galima taikyti ir bandomajai, ir etaloninei medžiagai trijų valandų sąlyčio trukmės atveju:

Naudojami keli indai (pvz., vieno–trijų litrų talpos laboratorinės stiklinės).

Turi būti naudojamos bent penkios koncentracijos, besiskiriančios pastoviu santykiu, geriausiai ne didesniu kaip 3,2.

Laiku „0“ 16 ml sintetinių nuotekų mitybinės terpės vandeniu skiedžiama iki 300 ml. Įpilama 200 ml mikrobinės sėjimo kultūros ir visas mišinys (500 ml) supilamas į pirmąjį indą (pirmasis kontrolinis bandinys C<sub>1</sub>).

Bandymo indai turi būti visą laiką aeruojami tiek, kad ištirpusio O<sub>2</sub> kiekis būtų ne mažesnis kaip 2,5 mg/litre ir kad prieš pat kvėpavimo intensyvumo matavimą O<sub>2</sub> koncentracija būtų apie 6,5 mg/litre.

Laiku „15 minučių“ (15 minučių trukmė yra laisvai pasirenkama, tačiau tai patogus laiko tarpas) kartojama, kas padaryta anksčiau, tik prieš tai, skiedžiant vandeniu iki 300 ml ir pilant mikrobinės sėjimo kultūros iki 500 ml, į 16 ml sintetinių nuotekų įpilama 100 ml pradinio bandomosios medžiagos tirpalo. Šis mišinys supilamas į antrą indą ir aeruojamas, kaip nurodyta aukščiau. Kas 15 minučių veiksmų seka kartojama imant skirtingus bandomosios medžiagos pradinio tirpalo tūrius, kad būtų gauta eilė indų su skirtingomis bandomosios medžiagos koncentracijomis. Galiausiai ruošiamas antrasis kontrolinis bandinys (C<sub>2</sub>).

Po trijų valandų fiksuojama pH vertė, ir gerai sumaišytas pirmojo indo turinio bandinys supilamas į matavimo aparatą, kuriuo ne ilgiau kaip 10 minučių matuojamas kvėpavimo intensyvumas.

Šis nustatymas kas 15 minučių kartojamas su kiekvieno indo turiniu tokiu būdu, kad sąlyčio trukmė visuose induose būtų trys valandos.

Tokiu pat būdu su kiekviena mikrobinės sėjimo terpės partija bandoma etaloninė medžiaga.

Jei reikia matuoti po 30 minučių sąlyčio, būtina taikyti kitokį matavimo režimą (pvz., turėti daugiau nei vieną deguonies matuoklį).

Jei reikia nustatyti cheminį deguonies suvartojimą, ruošiami papildomi indai su bandomąja medžiaga, sintetinių nuotekų mitybine terpe ir vandeniu, bet be aktyviojo dumblo. Deguonies suvartojimas matuojamas ir užrašomas po 30 minučių ir (ar) trijų valandų aeravimo (sąlyčio trukmė).

## 2. DUOMENYS IR VERTINIMAS

Kvėpavimo intensyvumas skaičiuojamas pagal savirašio užrašą apytikriai tarp 6,5 mg/litre O<sub>2</sub> ir 2,5 mg/litre O<sub>2</sub>, 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<sub>50</sub> (30 minučių ir (ar) trijų valandų) nėra priimtinaje intervale (nuo 5 iki 30 mg/litre 3,5-dichlorfenoliui), bandymas yra netinkamas ir turi būti pakartotas.

Inhibavimo procentinė vertė skaičiuojama kiekvienai bandomajai koncentracijai (žr. 1.2). Procentinės inhibavimo vertės priklausomybė nuo koncentracijos brėžiama logaritminiame-normaliame (ar logaritminiame-tikimybiname) popieriuje, ir gaunama EC<sub>50</sub> vertė.

95 % pasiklovimo ribos EC<sub>50</sub> vertėms gali būti nustatyti, taikant standartines metodikas.

### 3. ATASKAITA

#### 3.1. BANDYMO ATASKAITA

Bandymo ataskaitoje pateikiama, jei įmanoma, tokia informacija:

- bandomoji medžiaga: cheminio identifikavimo duomenys,
- bandymo sistema: aktyviojo dumblo šaltinis, koncentracija ir bet koks pradinis kondicionavimas,
- bandymo sąlygos:
  - reakcijos mišinio pH vertė prieš kvėpavimo intensyvumo matavimą,
  - bandymo temperatūra,
  - bandymo trukmė,
  - etaloninė medžiaga ir jos išmatuota EC<sub>50</sub> vertė,
  - abiotinis deguonies suvartojimas (jei tai vyko).
- rezultatai:
  - visi matavimuose gauti duomenys,
  - inhibavimo kreivė ir metodas EC<sub>50</sub> skaičiuoti,
  - EC<sub>50</sub> ir, jei įmanoma, 95 % pasiklivimo ribos, EC<sub>20</sub> ir EC<sub>80</sub>,
  - visi pastebėjimai ir bet kokie nukrypimai nuo šio bandymo metodo, kurie galėtų turėti įtakos rezultatui.

#### 3.2. DUOMENŲ AIŠKINIMAS

Į EC<sub>50</sub> 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 netipiškas inhibavimo kreives. Taigi šios kreivės turi būti aiškinamos atsargiai.

### 4. NUORODOS

- 1) International Standard ISO 8192–1986.
- 2) Broecker, B., Zahn, R., Water Research 11, 1977, p. 165.
- 3) Brown, D., Hitz, H. R., Schaefer, L., Chemosphere 10, 1981, p. 245.
- 4) ETAD (Ecological and 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.

## C.12. BIOLOGINIS SKAIDYMAS

## MODIFIKUOTAS SCAS BANDYMAS

## 1. METODAS

## 1.1. ĮVADAS

Metodo tikslas yra įvertinti vandenyje tirpių, nelakių organinių medžiagų galimą biologinį suskaidymą, kai jas ilgą laiką veikia palyginti didelės koncentracijos mikroorganizmai. Mikroorganizmų gyvybingumas tuo laikotarpiu palaikomas kasdien pridedant nusistovėjusių nuotekų mitybinės terpės. (Savaitgaliais nuotekas galima laikyti 4 °C temperatūroje. Dar galima naudoti sintetines nuotekas, kurios naudojamos OECD patvirtinamajame bandyme).

Ant suspenduotų kietųjų dalelių gali vykti fizikocheminė adsorbcija, todėl į tai turi būti atsižvelgta aiškinant rezultatus (žr. 3.2).

Dėl skystosios fazės didelės sulaikymo trukmės (36 valandos) ir dėl nutrūkstamo mitybinių medžiagų pridėjimo bandymas nemodeliuoja nuotekų valymo įrenginio sąlygų. Rezultatai, gauti su įvairiomis bandomosiomis medžiagomis, rodo, kad bandymas turi didelį biologinio skaidymo potencialą.

Bandyme sudarytos sąlygos yra labai palankios atrankai ir (ar) adaptavimui mikroorganizmų, galinčių suskaidyti bandomąją medžiagą. (Metodika gali būti taikoma ruošti aklimatizuotas sėjimo kultūras kitiems bandymams).

Šiame bandyme bandomosios medžiagos biologiniam suskaidymui įvertinti naudojamas ištirpusios organinės anglies kiekio matavimas. Būtų geriau, jei DOC būtų nustatoma po parūgštinimo ir prapūtimo, nei kaip skirtumas  $C_{\text{bendroji}} - C_{\text{neorganinė}}$ .

Lygiagrečiai taikant specifinį analizės metodą, gali būti įmanoma įvertinti medžiagos pirminį biologinį skaidymą (pirminės cheminės sandaros išnykimas).

Metodas tinka tik toms organinėms bandomosioms medžiagoms, kurios bandyme naudojamomis koncentracijomis:

- tirpios vandenyje (bent 20 mg/l ištirpusios organinės anglies),
- garų slėgis yra labai mažas,
- neinhibuoja bakterijų,
- bandymo sistemoje adsorbuojamos tik nežymiu laipsniu,
- iš bandomojo tirpalo nepradingsta dėl putojimo.

Turi būti nustatytas organinės anglies kiekis bandomoje medžiagoje.

Norint paaiškinti gautus rezultatus, ypač kai rezultatai yra žemi arba ribiniai, naudinga būtų turėti informacijos apie bandomosios medžiagos pagrindinių komponentų santykinę dalį.

Kai reikia paaiškinti žemus rezultatus ir pasirinkti tinkamą bandomąją koncentraciją, naudinga turėti informacijos apie medžiagos toksiškumą mikroorganizmams.

## 1.2. APIBRĖŽTYS IR VIENETAI

- $C_T$  = bandomojo junginio koncentracija, skaičiuojama organinės anglies kiekiu, kuris yra nusistovėjusiose nuotekose ar pridedamas į jas aeravimo laikotarpio pradžioje (mg/litre),
- $C_t$  = ištirpusios organinės anglies koncentracija, nustatyta bandomajame skystyje virš nuosėdų aeravimo laikotarpio pabaigoje (mg/litre),
- $C_c$  = ištirpusios organinės anglies koncentracija, nustatyta kontrolinio bandinio skystyje virš nuosėdų aeravimo laikotarpio pabaigoje (mg/litre).

Šiame bandyme biologinis skaidymas nustatomas kaip organinės anglies išnykimas. Biologinį skaidymą galima išreikšti:

1. Kasdien įdedamos medžiagos šalinimo procentine verte  $D_{da}$ :

$$D_{da} = \left( \frac{(C_T - (C_t - C_c))}{C_T} \times 100 \right) \quad [1]$$

čia

$D_{da}$  = skaidymas/kasdieninis pridėjimas.

2. Kiekvienos dienos pradžioje turimo medžiagos kiekio šalinimo procentinė vertė  $D_{ssd}$ :

$$D_{ssd} = \left( \left( \frac{(2C_T + C_{ti} - C_{ci} - 3C_{t(i+1)} + 3C_{c(i+1)})}{(2C_T + C_{ti} - C_{ci})} \right) \times 100 \right) \quad [2 (a)]$$

$$\approx \left( \left( \frac{(2C_T - 2(C_t - C_c))}{(2C_T + (C_t - C_c))} \right) \times 100 \right) \quad [2 (b)]$$

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.

### 1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Kai kuriais atvejais, kai tiriamos naujos medžiagos, etaloninės medžiagos gali būti naudingos, tačiau nėra specifinės etaloninės medžiagos, kurią galima būtų rekomenduoti šiam bandymui.

Visų pirma, yra pateikti duomenys apie kelis junginius, įvertintus tarplaboratorinio lyginimo bandymuose (žr. 1 priedėlį), kad retkarčiais būtų galima metodą sutikrinti ir jo rezultatus lyginti su rezultatais, gautais kitais metodais.

### 1.4. BANDYMO METODO PRINCIPAS

Aktyvūs dumblas iš nuotekų valymo įrenginio dedamas į pusiau nepertraukiamo veikimo aktyviojo dumblo įrenginį (*Semi-Continuous Activated Sludge* (SCAS)). Įdedama bandomosios medžiagos ir nusistovėjusių buitinių nuotekų, ir mišinys aeruojamas 23 valandas. Paskui aeravimas stabdomas, dumblas paliekamas nusistovėti ir skystis virš dumblo pašalinamas.

Aeravimo kameroje likęs dumblas maišomas su kita bandomosios medžiagos ir nuotekų dalimi ir ciklas kartojamas.

Biologinio skaidymo buvimas įrodomas, nustatant ištirpusios organinės anglies kiekį skystyje virš dumblo. Ši vertė lyginama su verte, gauta skysčiui kontroliniame mėgintuvėlyje, kuriame buvo tik nusistovėjusios nuotekos.

Kai taikomas specifinis analizės metodas, galima nustatyti pradinės medžiagos koncentracijos pokyčius dėl jos molekulių biologinio skaidymo (pirminis biologinis skaidumas).

## 1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

Šio metodo, kuris remiasi ištirpusios organinės medžiagos šalinimu, atkuriamumas dar nėra nustatytas. (Kai tiriamas pirminis biologinis skaidymas, labai tikslūs duomenis yra gaunami medžiagoms, kurios labai išsiskaido).

Metodo jautrumas labai priklauso nuo tuščiojo bandinio kintamumo ir, kiek mažiau, nuo ištirpusios anglies nustatymo preciziškumo ir bandomosios medžiagos kiekio skystyje kiekvieno ciklo pradžioje.

## 1.6. BANDYMO PROCEDŪROS APRAŠYMAS

### 1.6.1. *Paruošiamieji darbai*

Oro tiekimo vamzdeliai (1 paveikslas) jungiami prie reikiamo skaičiaus švarių aeravimo įrenginių, skirtų kiekvienai bandomajai medžiagai ir kontroliniams bandiniams, arba galima naudoti originalųjį 1,5 litro SCAS bandymo įrenginį. Į įrenginius per medvilnės filtrą tiekiamame suslėgtime 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.

Pradiniam bandomosios medžiagos tirpalams ruošti naudojamas distiliuotas vanduo; paprastai reikia, kad organinės anglies koncentracija būtų 400 mg/litre, tokiu atveju bandomojo junginio koncentracija kiekvieno aeravimo ciklo pradžioje, kai nevyksta biologinis skaidymas, yra 20 mg/litre.

Galima naudoti didesnes koncentracijas, jei tai įmanoma atsižvelgiant į medžiagos toksiškumą mikroorganizmams.

Nustatomas organinės anglies kiekis pradinuose tirpaluose.

### 1.6.2. *Bandymo sąlygos*

Bandymas turi būti atliekamas 20–25 °C temperatūroje.

Naudojama didelė aerobinių mikroorganizmų koncentracija (nuo 1 iki 4 g/litre suspenduotų kietųjų dalelių), ir tikroji sulaukymo trukmė yra 36 valandos. Anglingoji medžiaga nuotekų mitybinėje terpėje stipriai oksiduojama, paprastai tai įvyksta per aštuonias valandas nuo kiekvieno aeravimo ciklo pradžios. Po to, iki aeravimo laikotarpio pabaigos dumblas kvėpuoja endogeniškai, tuo metu vienintelis substratas yra bandomasis junginys, jei jis pats nebuvo lengvai išsivertęs. Šios savybės, kartu su sėjimo kultūros kasdieniu keitimu, kai terpe naudojamos buitines nuotekos, užtikrina labai palankias aklimatizavimo sąlygas ir galimybę biologiškai stipriai skaidyti.

### 1.6.3. *Bandymo procedūra*

Iš tinkamo aktyviojo dumblo valymo įrenginio ar laboratorinio įrenginio, skirto valyti daugiausia buitines nuotekas, imamas nuotekų ir aktyviojo dumblo mišinys, kuris visą laiką, kol bus panaudotas laboratorijoje, laikomas aerobinėmis sąlygomis. Į kiekvieną aeravimo įrenginį ir į kontrolinį įrenginį įpilama po 150 ml šio mišinio (jei naudojamas originalus SCAS bandymo įtaisas, nurodytus tūrius reikia dauginti iš 10) ir pradama aeruoti. Po 23 valandų aeravimas baigiamas ir dumblas 45 minutėms paliekamas nusistovėti. Kiekvienas indas paeiliui atkempamas, ir iš jo išsiurbiamas 100 ml skysčio virš dumblo. Prieš pat naudojimą paimamas nusistovėjusių buitinių nuotekų bandinys, ir 100 ml nuotekų įpilama į kiekvieną aeravimo įrenginį su likusiu jame dumblu. Vėl pradama aeruoti. Šioje pakopoje bandomoji medžiaga nededama, ir į įrenginius kasdien pilama buitinių nuotekų tik tol, kol skystis virš nusistovėjusio dumblo tampa skaidrus. Tai dažniausiai trunka ne ilgiau kaip dvi savaites, per tą laiką ištirpusios organinės anglies kiekis skystyje virš dumblo kiekvieno aeravimo ciklo pabaigoje priartėja prie pastovios vertės.

Kai šis laikotarpis baigiasi, atskirieji nusistovėjusio dumblo bandiniai yra sumaišomi ir į kiekvieną įrenginį dedama po 50 ml gauto sudėtinio dumblo.

Į kontrolinius įrenginius įpilama 95 ml nusistovėjusių nuotekų ir 5 ml vandens, į bandomuosius įrenginius įpilama 95 ml nusistovėjusių nuotekų ir 5 ml atitinkamos bandomojo junginio pradinio tirpalo (400 mg/litre). Aeruoti pradama iš naujo ir aeravimas tęsiamas 23 valandas. Po to dumblas paliekamas 45 minutėms nusistovėti, skystis virš dumblo nusiurbiamas ir jame nustatomas ištirpusios organinės anglies kiekis.

Aukščiau aprašytas užpylimo ir siurbimo procesas kartojamas kasdien iki bandymo pabaigos.

Prieš paliekant dumblą nusistovėti, 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 kasdien, nors analizę leidžiama atlikti rečiau. Prieš analizę skysčiai filtruojami per išplautus 0,45 µm membraninius filtrus ar centrifuguojami. Membraniniai filtrai tinka, jei užtikrinama, kad filtravimo pakopoje jie neišskiria anglies ir nesugeria medžiagos. Centrifuguojamo bandinio temperatūra neturi būti didesnė kaip 40 °C.

Bandymo trukmė junginiams, kurie yra mažai biologiškai skaidomi arba visiškai neskaidomi, nėra apibrėžta, tačiau patirtis rodo, kad dažniausiai tai turi trukti bent 12 savaitių, bet ne ilgiau kaip 26 savaites.

## 2. DUOMENYS IR VERTINIMAS

Ištirpusios anglies kiekio vertės, nustatytos bandomuosiuose ir kontroliniuose skysčiuose virš nuosėdų, atidedamos grafiškai kaip laiko funkcija.

Baigus biologinį skaidymą, bandomajame bandinyje nustatytas lygis artėja prie kontroliniame bandinyje nustatyto lygio. Kai skirtumas tarp abiejų lygių trijuose iš eilės matavimuose nekinta, dar daroma tiek matavimų, kiek jų pakanka duomenims statistiškai apdoroti, ir skaičiuojama bandomosios medžiagos biologinio skaidymo procentinė vertė ( $D_{da}$  ar  $D_{ssd}$ , žr. 1.2).

## 3. ATASKAITA

### 3.1. BANDYMO ATASKAITA

Bandymo ataskaitoje pateikiama, jei įmanoma, tokia informacija:

- visa informacija apie nuotekų prigimtį, naudoto įrenginio tipą ir eksperimentiniai rezultatai, gauti bandomajai medžiagai, etaloninei medžiagai, jei buvo naudojama, ir tuščiajam bandiniui,
- temperatūra,
- šalinimo kreivė su aprašymu, skaičiavimo būdu (žr. 1.2),
- data ir vieta, kur buvo imti aktyviojo dumblo ir nuotekų bandiniai, adaptavimo būseną, koncentracija ir t. t.,
- mokslinis bet kokių bandymo metodikos keitimų pagrindimas,
- parašas ir data.

### 3.2. DUOMENŲ AIŠKINIMAS

Kadangi medžiaga, skirta šiuo metodu bandyti, biologiškai nėra lengvai skaidoma, bet koks DOC šalinimas vien tik dėl biologinio skaidymo paprastai vyksta laipsniškai dienas ar savaites, išskyrus tuos atvejus, kai įvyksta staigus aklimatizavimas, apie kurį rodo staigus išnykimas, įvykstantis po kelių savaitių.

Tačiau kartais svarbų vaidmenį gali vaidinti fizikocheminė adsorbcija; tai rodo pridėtos DOC visiškas ar dalinis išnykimas bandymo pradžioje. Kas atsitinka vėliau, priklauso nuo kai kurių faktorių, pvz., adsorbcijos laipsnio ir suspenduotų kietųjų dalelių koncentracijos išleidžiamajame ištakyje. Paprastai skirtumas tarp DOC koncentracijos kontroliniame bandinyje ir bandomosios medžiagos skystyje virš nuosėdų laipsniškai didėja nuo pradinės mažos vertės ir toliau šis skirtumas, pasiekęs naują vertę, išlieka toks iki bandymo pabaigos, jei neįvyksta aklimatizavimas.

Jei reikia atskirti biologinį skaidymą (ar dalinį biologinį skaidymą) ir adsorbciją, būtina atlikti tolesnius bandymus. Tai galima daryti įvairiais būdais, tačiau įtikinamiausias būdas yra pamatiniame bandyme (geriau, kad tai būtų respirometrinis bandymas) sėjimo kultūra naudoti skystį virš dumblo ar dumblą.

Bandomosios medžiagos, kurių neadsorbcinio DOC šalinimo vertės bandyme yra didelės, turi būti laikomos potencialiai biologiškai skaidomomis. Dalinis neadsorbcinis šalinimas rodo, kad cheminė medžiaga bent kažkiek yra biologiškai skaidoma.

Mažos ar nulinės DOC šalinimo vertės gali būti dėl mikroorganizmų inhibavimo bandomąja medžiaga, tai dar gali parodyti dumblo irimas ir jo kiekio mažėjimas, dėl ko skystis virš dumblo drumsčiasi. Bandymas turi būti pakartotas naudojant mažesnę bandomosios medžiagos koncentraciją.

Naudojant specifinį junginio analizės metodą ar bandomąsias medžiagas su žymėtais  $^{14}\text{C}$  atomais, gali būti pasiektas didesnis jautrumas. Jei bandomasis junginys turi  $^{14}\text{C}$ ,  $^{14}\text{CO}_2$  surinkimas patvirtintų, kad biologinis skaidymas įvyko.

Kai duomenys pateikiami, kaip pirminio biologinio skaidymo rezultatai, turi būti paaiškinta, jei tai įmanoma, kaip pakito cheminė sandara, kad neliko pradinės bandomosios medžiagos atsako.

Turi būti pateiktas analizės metodo tinkamumo patvirtinimas ir tuščiojo bandinio terpėje nustatyta skaidymo vertė.

#### 4. NUORODOS

- 1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 302 A, Decision of the Council C(81) 30 final.

## 1 priedėlis

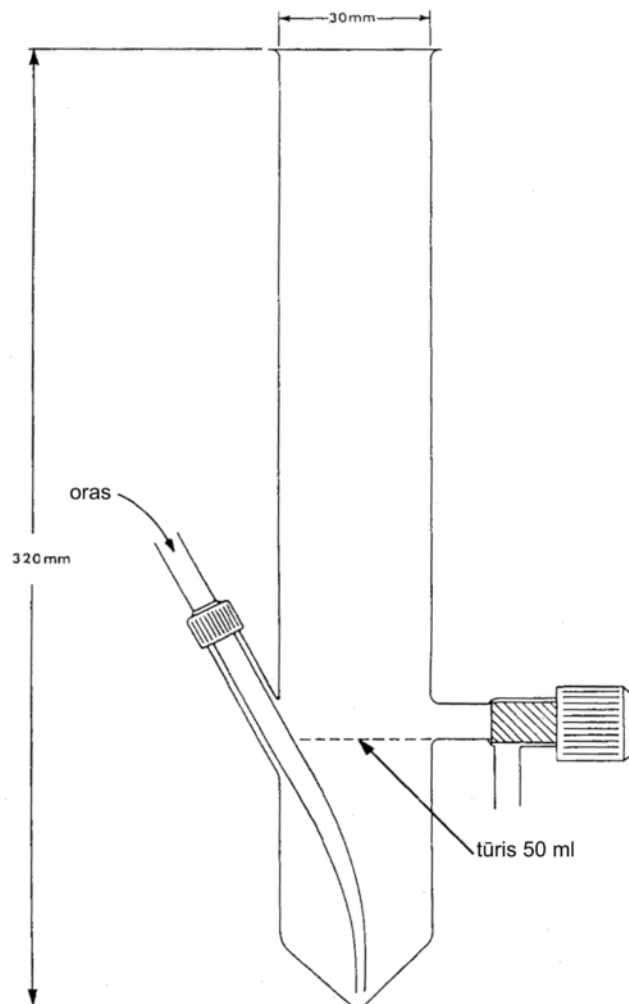
## SCAS bandymas. Rezultatų pavyzdys

Medžiaga	$C_T$ (mg/l)	$C_T - C_c$ (mg/l)	Biologinio skaidymo procentas $D_{da}$	Bandymo trukmė (paros)
4-acetilaminobenzensulfonatas	17,2	2,0	85	40
Tetrapropilenbenzensulfonatas	17,3	8,4	51,4	40
4-nitrofenolis	16,9	0,8	95,3	40
Dietilenglikolis	16,5	0,2	98,8	40
Anilinas	16,9	1,7	95,9	40
Ciklopentano tetrakarboksilatas	17,9	3,2	81,1	120



## 2 priedėlis

## Bandymo aparato pavyzdys



C.13. **BIOLOGINIS KONCENTRAVIMAS. DINAMINIS BANDYMAS SU ŽUVIMIS**1. **METODAS**

Šis biologinio koncentravimo metodas yra OECD TG 305 (1996) kopija.

1.1. **ĮVADAS**

Šis metodas aprašo pratekėjimo sąlygomis vykstančio medžiagų biologinio kaupimosi žuvyse gebos apibūdinimo metodiką. Nors kur kas geriau taikyti dinaminį bandymo metodą, leidžiama naudoti pusiau stacionarius režimus, jei jie atitinka tinkamumo kriterijus.

Metode pateikiamas pakankamas kiekis bandymui atlikti reikalingų detalių, tačiau paliekama atitinkama laisvė eksperimento schemai pritaikyti konkrečių laboratorijų sąlygoms ir keisti bandomųjų medžiagų charakteristikas. Jis labiausiai tinka patvarioms organinėms medžiagoms, kurių  $\log P_{ow}$  vertės yra nuo 1,5 iki 6,0 (1), tačiau gali būti taikomas ir ypatingai lipofilinėms medžiagoms (kurių  $\log P_{ow} > 6,0$ ). Tokių ypatingai lipofilinių medžiagų biologinio koncentravimo faktorius (BKF), kartais žymimo  $K_B$ , išankstinis įvertis greičiausiai būtų didesnis, nei pastoviosios būsenos biologinio koncentravimo faktorius ( $BKF_{NB}$ ) vertė, kurios reikėtų laukti laboratoriniuose bandymuose. Medžiagų, kurių  $\log P_{ow}$  vertės yra iki 9,0, išankstiniai biologinio koncentravimo faktorius įverčiai gali būti gauti naudojant Bintein *et al.* lygtį (2). Parametrams, kurie apibūdina biologinio koncentravimo gebą, priklauso sugerties greičio konstanta ( $k_1$ ), apšalyimo greičio konstanta ( $k_2$ ) ir  $BKF_{NB}$ .

Žymėtuosius atomus turinčios bandomosios medžiagos gali palengvinti vandens ir žuvų bandinių analizę ir gali būti naudojamos norint nustatyti, ar reikia atlikti irimo produktų identifikavimą ir kiekybinį nustatymą. Jei matuojamas bendras radioaktyviųjų likučių kiekis (pvz., deginant arba tirpinant audinius), BKF remiasi pradinio junginio, visų sulaikytų metabolitų, o taip pat įsisavintos anglies kiekiu. Taigi, BKF vertės, besiremiančios bendruoju radioaktyviųjų likučių kiekiu, negali būti tiesiogiai lyginamos su BKF vertėmis, gautomis atliekant tik pradinio junginio specifinę cheminę analizę.

Norint nustatyti BKF, kuris remiasi tik pradinio junginio kiekiu, tyrimuose su žymėtaisiais atomais gali būti naudojamos gryninimo metodikos, o pagrindiniai metabolitai gali būti apibūdinti, jei manoma, kad tai yra būtina. Analizuojant ir identifikuojant likučius audiniuose, galima sujungti medžiagų apykaitos žuvyse tyrimus su biologinio koncentravimo tyrimais.

1.2. **APIBRĖŽTYS IR VIENETAI**

Biologinis koncentravimas/biologinis kaupimas yra bandomosios medžiagos koncentracijos didėjimas organizme (nustatytuose jo audiniuose) arba organizmo paviršiuje lyginant su bandomosios medžiagos koncentracija aplinkinėje terpėje.

Biologinio koncentravimo faktorius (BKF arba  $K_B$ ) bet kuriuo šio koncentravimo bandymo sugerties tarpsnio metu yra bandomosios medžiagos koncentracijos žuvies viduje (paviršiuje) arba nustatytuose jos audiniuose ( $C_f$ ,  $\mu\text{g/g}$  (ppm)) ir cheminės medžiagos koncentracijos aplinkinėje terpėje ( $C_w$  kaip  $\mu\text{g/ml}$  (ppm)) santykis.

Pastoviosios būsenos biologinio koncentravimo faktorius ( $BKF_{NB}$  arba  $K_B$ ) žymiai nekinta ilgesnį laiko tarpą, bandomosios medžiagos koncentracijai aplinkinėje terpėje šį laiko tarpą esant pastoviai.

Horizontalioji dalis arba pastovioji būsena pasiekama tuomet, kai bandomosios medžiagos koncentracijos žuvyje ( $C_f$ ) priklausomybės nuo laiko kreivė tampa lygiagreči 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 bandomosioms medžiagoms labiau tiktų septynių parų tarpai.

Biologinio koncentravimo faktorius, apskaičiuotas tiesiog iš kinetinių greičio konstantų ( $k_1/k_2$ ), yra vadinamas kinetiniu koncentravimo faktoriumi,  $BKF_K$ .

Pasiskirstymo koeficientas (n-oktanolis/vanduo) ( $P_{ow}$ ) yra cheminės medžiagos pusiausvyros tirpumo n-oktanolyje ir vandenyje santykis (A.8 metodas), taip pat išreiškiamas  $K_{ow}$ .  $P_{ow}$  logaritmas naudojamas kaip cheminės medžiagos biologinio koncentravimo vandens organizmuose gebos rodiklis.

Veikimo arba sugerties tarpsnis yra laikas, kurį žuvis yra veikama bandomąja medžiaga.

Sugerties greičio konstanta ( $k_1$ ) yra skaitinė vertė, apibūdinanti bandomosios medžiagos koncentracijos žuvyje arba jos paviršiuje (arba nustatytuose jos audiniuose) didėjimo greitį, kai žuvis veikama chemine medžiaga ( $k_1$  išreiškiama  $\text{para}^{-1}$ ).

Tarpsnis po veikimo arba apšalymo (netekimo) tarpsnis yra laikas po to, kai bandomoji žuvis buvo pernešta iš terpės su bandomąja medžiaga į terpę, kurioje šios medžiagos nėra, per kurį tiriamas apšalymas (arba bendras mažėjimas) nuo šios medžiagos žuvyje (arba nustatytuose jos audiniuose).

Apsivalymo (netekimo) greičio konstanta ( $k_2$ ) yra skaitinė vertė, apibūdinanti bandomosios medžiagos koncentracijos žuvyje arba jos paviršiuje (arba nustatytuose jos audiniuose) mažėjimo greitį po to, kai bandomoji žuvis buvo pernešta iš terpės su bandomąja medžiaga į terpę, kurioje šios medžiagos nėra ( $k_2$  išreiškiama  $\text{para}^{-1}$ ).

### 1.3. BANDYMO METODO PRINCIPAS

Bandymas susideda iš dviejų tarpsnių: veikimo (sugerties) ir tarpsnio po veikimo (apsivalymo). Sugerties tarpsnio metu atskiros vienos rūšies žuvų grupės veikiamos bent dviejų koncentracijų bandomąja medžiaga. Vėliau apšalymo tarpsniui jos pernešamos į terpę be bandomosios medžiagos. Apsivalymo tarpsnis būtinas visuomet, išskyrus atvejus, kai medžiagos sugertis sugerties tarpsnio metu buvo neįdomi (pvz., BKF yra mažesnis kaip 10). Bandomosios medžiagos koncentracija žuvyje (jos paviršiuje) (arba nustatytuose jos audiniuose) matuojama abiejuose bandymo tarpsniuose. Be dviejų bandomųjų koncentracijų, kontrolinė žuvų grupė laikoma tokiomis pačiomis sąlygomis, bet be bandomosios medžiagos, norint biologinio koncentravimo bandyme pastebėtą galimą neigiamą poveikį palyginti su palyginamąja kontroline grupe ir gauti bandomosios medžiagos fono koncentracijas.

Sugerties tarpsnis vykdomas 28 paras, jei neįrodoma, kad pusiausvyra yra pasiekta anksčiau. Sugerties tarpsnio trukmės ir pastoviosios būsenos laiko prognozė gali būti padaryta pagal 3 papildymo lygtį. Pernešus žuvis į kitą švarų indą su ta pačia terpe, bet be bandomosios medžiagos, pradedamas apšalymo periodas. Pageidautina, jei įmanoma, biologinio koncentravimo faktorių apskaičiuoti ir kaip santykį koncentracijos žuvyje ( $C_f$ ) su koncentracija vandenyje ( $C_w$ ) tariamosios pastoviosios būsenos sąlygomis ( $\text{BKF}_{\text{NB}}$ ) ir kaip kinetinį biologinio koncentravimo faktorių ( $\text{BKF}_K$ ), išreiškiamą sugerties ( $k_1$ ) ir apšalymo ( $k_2$ ) greičio konstantų santykiu, darant prielaidą apie pirmojo laipsnio kinetiką. Jei pirmojo laipsnio kinetikos akivaizdžiai nepaisoma, turi būti naudojami sudėtingesni modeliai (5 priedėlis).

Jei pastovioji būsena per 28 paras nepasiekama, sugerties tarpsnis turi būti pratęstas, kol ji bus pasiekta, bet ne ilgiau kaip iki 60 parų; tuomet pradedamas apšalymo tarpsnis.

Sugerties greičio konstanta, apšalymo (netekimo) greičio konstanta (ar konstantos, jei naudojami sudėtingesni modeliai), biologinio koncentravimo faktorius ir, jei įmanoma, kiekvieno šių parametrų pasiklovimo ribos apskaičiuojami pagal modelį, kuris geriausiai aprašo žuvyse ir vandenyje išmatuotas bandomosios medžiagos koncentracijas.

BKF yra išreiškiamas kaip žuvies bendrosios šlapios masės funkcija. Tačiau specialioms tikslams, jei žuvis yra pakankamai didelė, gali būti naudojami nustatyti audiniai arba organai (pvz., raumuo, kepenys) arba žuvis gali būti padalinta į valgomąją (filė) ir nevalgomą (viduriai) dalis. Kadangi daugelio organinių medžiagų biologinio koncentravimo geba aiškiai priklauso nuo lipofiliškumo, taip pat yra atitinkama priklausomybė tarp riebalų kiekio bandomosiose žuvyse ir stebimo tokių medžiagų biologinio koncentravimo. Tokiu būdu, norint sumažinti šį bandymo rezultatų kintamumo šaltinį, lipofiliškų (t. y. kurių  $\log P_{\text{ow}} > 3$ ) medžiagų biologinis koncentravimas turi būti apskaičiuojamas ne tik viso kūno masei, bet ir riebalų kiekiui.

Kai tai galima įgyvendinti, riebalų kiekis turi būti nustatomas toje pačioje biologinėje medžiagoje, kurioje nustatoma bandomosios medžiagos koncentracija.

### 1.4. INFORMACIJA APIE BANDOMĄJĄ MEDŽIAGĄ

Prieš atliekant biologinio koncentravimo bandymą apie bandomąją medžiagą turi būti žinoma tokia informacija:

— tirpumas vandenyje,

- pasiskirstymo koeficientas (n-oktanolis/vanduo)  $P_{ow}$  (taip pat žymimas  $K_{ow}$ , nustatomas HPLC metodu pagal A. 8),
- hidrolizė,
- fotocheminis virsmas vandenyje, nustatytas apšvietimo saulės arba modeliuota saulės spinduliuote sąlygomis ir biologinio koncentravimo bandyme naudoto apšvietimo sąlygomis (3),
- paviršiaus įtempis (t. y. medžiagoms, kurioms  $\log P_{ow}$  negali būti nustatytas),
- garų slėgis,
- biologinio skaidumo lengvumas (jei reikia).

Kita reikalinga informacija yra toksiškumas bandyme naudojamoms žuvų rūšims, geriausiai asimptotiška (t. y. nuo laiko nepriklausanti)  $LC_{50}$  vertė. Reikia turėti tinkamą žinomo tikslumo, preciziškumo ir jautrumo analizinį metodą bandomajai medžiagai bandomuosiuose tirpaluose ir biologinėje medžiagoje kiekybiškai nustatyti, taip pat bandinių ruošimo ir laikymo detales. Tai pat turi būti žinoma bandomosios medžiagos analizinio nustatymo vandenyje ir žuvies audiniuose riba. Kai naudojama  $^{14}C$  žymėta bandomoji medžiaga, turi būti žinoma radioaktyvumo dėl priemaišų buvimo procentinė dalis.

#### 1.5. BANDYMO TINKAMUMAS

Turi būti taikomos tokios sąlygos, kad bandymas būtų tinkamas:

- temperatūros kitimas mažesnis kaip  $\pm 2$  °C;
- ištirpusio deguonies koncentracija neturi sumažėti daugiau kaip iki 60 % soties koncentracijos;
- sugerties tarpsnio metu bandomosios medžiagos koncentracija kameroje palaikoma vidutinių išmatuotų verčių ribose su  $\pm 20$  % nuokrypiu;
- bandymo pabaigoje kontrolinių ir veikiamų žuvų gaištamumas arba kiti neigiami veiksniai (liga) yra mažesnis kaip 10 %; jei bandymas vyksta kelias savaites arba mėnesius, gaištamumas arba kiti neigiami veiksniai abiejose žuvų grupėse turi būti mažesni kaip 5 % per mėnesį, o bendras gaištamumas ne didesnis kaip 30 %.

#### 1.6. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Tikrinant eksperimento metodiką, prireikus būtų naudinga naudoti etalonines medžiagas su žinoma biologinio koncentravimo geba. Tačiau specialios medžiagos vis dar negali būti rekomenduotos.

#### 1.7. BANDYMO METODO APRAŠYMAS

##### 1.7.1. Aparatūra

Reikia žiūrėti, kad visoms įrangos dalims gaminti būtų vengiama naudoti medžiagas, kurios gali tirpti, sugerti arba išsiplauti ir turėti neigiamą poveikį žuvisms. 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<sup>®</sup>, nerūdijančio plieno ir (arba) stiklo. Patirtis rodo, kad medžiagoms su dideliu sugerties koeficientu, pvz., sintetiniams piretroidams, gali būti reikalingas silanizuotas stiklas. Tokiais atvejais įranga po naudojimo turėtų būti išmesta.

##### 1.7.2. Vanduo

Bandymuose dažniausiai naudojamas gamtinis vanduo, jis turi būti imamas iš neužteršto ir vienodos kokybės šaltinio. Skiedimo vandens kokybė turi būti tokia, kad pasirinktų rūšių žuvis nežūtų per aklimatizavimo ir bandymo laiką ir jų išvaizdoje arba elgesyje neatsirastų kažko neįprasto. Geriausiai atveju reikėtų pademonstruoti, kad bandomosios rūšys skiedimo vandenyje gali išlikti, augti ir daugintis (pvz., laboratorinėje kultūroje arba atliekant toksiškumo ilgaamžiškumo ciklui bandymą). Apibūdinant vandenį turi būti nurodyta bent pH vertė,

kietumas, bendras kietųjų dalelių kiekis, bendroji organinė anglis, taip pat pageidautina nurodyti amonio ir nitrato jonų kiekį bei šarminumą, ir, jūros žuvų rūšių atveju, rūšumą. Parametrai, kurie būtų svarbūs žuvų optimaliai gerovei, yra visiškai žinomi, tačiau 1 priedėlyje pateiktos rekomenduojamos bandymuose naudojamo gėlo ir jūros vandens įvairių komponentų didžiausios koncentracijos.

Vandens kokybė turi būti pastovi visą bandymo laiką. pH vertė turi būti 6,0–8,5 intervale, tačiau konkrečiame bandyme pH reikšmė turi būti  $\pm 0,5$  pH vieneto ribose. Norint užtikrinti, kad skiedimo vanduo per daug neturėtų įtakos bandymo rezultatui (pavyzdžiui, sudarydamas kompleksus su bandomąja medžiaga) arba neigiamai veiktų žuvų būrio elgesį, bandiniai per tam tikrus laiko tarpus turi būti imami analizei. Sunkiųjų metalų jonų (pvz., Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), pagrindinių anijonų ir katijonų (pvz., Ca, Mg, Na, K, Cl, SO<sub>4</sub>), pesticidų (pvz., bendrojo fosforo organinių ir chloro organinių pesticidų kiekio), bendrosios organinės anglies ir suspenduotų kietųjų dalelių analizė turi būti atliekama, pavyzdžiui, kas tris mėnesius, jei žinoma, kad skiedimo vandens kokybė yra gana pastovi. Jei įrodyta, kad vandens kokybė yra pastovi bent metus, analizė gali būti atliekama ne taip dažnai, o tarpai tarp jų padidinti (pvz., kas šešis mėnesius).

Natūralus kietųjų dalelių kiekis, o taip pat bendrosios organinės anglies (TOC) kiekis skiedimo vandenyje turi būti kuo mažesnis, kad būtų išvengta bandomosios medžiagos sugerties organine medžiaga, dėl ko gali sumažėti bandomosios medžiagos biologinis prieinamumas (4). Didžiausias kietųjų dalelių leistinas kiekis yra 5 mg/l (sausos medžiagos, sulaikomos 0,45  $\mu$ m filtru), o bendrosios organinės anglies – 2 mg/l (žr. 1 priedėlį). Jei reikia, vanduo prieš naudojimą turi būti filtruojamas. Dėl bandomųjų žuvų (ekskrementų) ir maisto likučių susidaręs organinės anglies kiekis turi būti kiek įmanoma mažesnis. Organinės anglies koncentracija bandymo rezervuare visą bandymo laiką neturi viršyti bandomojoje medžiagoje ir, jei naudojama, tirpinimo medžiagoje esančios organinės anglies koncentracijos daugiau kaip 10 mg/l ( $\pm 20$  %)

#### 1.7.3. Bandomieji tirpalai

Ruošiamas reikiamos koncentracijos bandomosios medžiagos pradinis tirpalas. Pradinį tirpalą geriausiai būtų ruošti bandomąją medžiagą tiesiog maišant arba plakant skiedimo vandenyje. Naudoti tirpiklius arba disperguojančias medžiagas (tirpinimo medžiagas) nerekomenduojama; tačiau jų gali prireikti kai kuriais atvejais, norint pagaminti pakankamai koncentruotą pradinį tirpalą. Tirpikliai, kuriuos būtų galima naudoti, yra etanolis, metanolis, etilenglikolio monometilo eteris, etilenglikolio dimetilo eteris, dimetilformamidas ir trietilenglikolis. Disperguojančios medžiagos, kurias galima naudoti, yra Cremophor RH40, Tween 80, metilceliuliozės 0,01 % tirpalas ir HCO-40. Naudojant biologiškai lengvai skaidomas medžiagas reikia žiūrėti, kad neatsirastų problemų dėl bakterijų augimo bandymuose pratekančiame vandenyje. Bandomoji medžiaga gali turėti žymėtuosius atomus ir turi būti aukščiausio grynumo (pvz., geriausiai > 98 %).

Bandymuose su pratekančiu vandeniu bandomajai koncentracijai bandymo kameroje užtikrinti reikalinga sistema, kuri nuolat dozuotų ir skiestų bandomosios medžiagos pradinį tirpalą (pvz., dozuojantis siurblys, proporcingas skiestuvas, saturatoriaus sistema). Geriausiai būtų daryti bent penkis vandens tūrio keitimus per dieną kiekvienoje bandymo kameroje. Geriau naudoti dinaminį režimą, tačiau kai tai neįmanoma (pvz., kai tai kenkia bandomiesiems organizmams), galima taikyti pusiau stacionariąją metodiką, jei ji atitinka tinkamumo kriterijus. Pradinio tirpalo ir skiedimo vandens srautas turi būti tikrinamas 48 valandas prieš bandymą ir vėliau bent kasdien visą bandymo laiką. Šio tikrinimo metu nustatomas srautas per kiekvieną kamerą ir užtikrinama, kad jis kameroje arba tarp kamerų nesikeistų daugiau kaip 20 %.

#### 1.7.4. Žuvų rūšies parinkimas

Pasirenkant rūšis svarbu yra tai, ar jas lengva gauti, ar galima gauti tinkamų dydžių žuvis ir ar galima žuvis tinkamai prižiūrėti laboratorijoje. Kiti žuvų rūšies pasirinkimo kriterijai apima rekreacinę, komercinę, ekologinę svarbą, taip pat palyginamą jautrumą, sėkmingą naudojimą praeityje ir t. t.

Rekomenduojamos bandomosios rūšys pateiktos 2 priedėlyje. Galima naudoti kitas rūšis, tačiau tinkamoms bandymo sąlygoms užtikrinti gali tekti keisti bandymo metodiką. Šiuo atveju ataskaitoje turi būti pateikta rūšies pasirinkimo priežastis ir bandymo metodas.

#### 1.7.5. Žuvų laikymas

Laikomų žuvų populiacija bent dvi savaites aklimatizuojama vandenyje bandymo temperatūroje ir pakankamai maitinama tos pačios rūšies maistu, kuris bus naudojamas bandyme.

Po 48 valandų stabilizacijos periodo, registruojamas gaištamumas ir taikomi tokie kriterijai:

— populiacijos gaištamumas per septynias paras didesnis kaip 10 %: visa partija atmetama,

- populiacijos gaištamumas per septynias paras 5–10 %: aklimatizuojama dar septynias papildomas paras,
- populiacijos gaištamumas per septynias paras mažesnis kaip 5 %: partija priimama, jei gaištamumas per kitas septynias dienas didesnis kaip 5 %, visa partija atmetama.

Reikia žiūrėti, kad bandymuose naudojamos žuvis neturėtų pastebimų ligų ir nenormalumų. Pašalinamos visos ligotos žuvis. Žuvis dvi savaites prieš pradedant bandymą arba bandymo metu neturi būti gydomos nuo ligų.

## 1.8. BANDYMO ATLIKIMAS

### 1.8.1. Išankstinis bandymas

Gali būti naudinga atlikti išankstinį bandymą, norint optimizuoti galutinio bandymo sąlygas, pvz., bandomosios medžiagos koncentraciją (-as), sugerties ir apsivalymo tarpinių trukmę.

### 1.8.2. Veikimo sąlygos

#### 1.8.2.1. Sugerties tarpsnio trukmė

Sugerties tarpsnio trukmės prognozavimas gali būti daromas remiantis praktine patirtimi (pvz., iš ankstesnio panašios cheminės medžiagos sugerties tyrimo) arba pagal tam tikras empirines priklausomybes, naudojant tirpumo vandenyje duomenis arba bandomosios medžiagos pasiskirstymo koeficientą (n-oktanolis/vanduo) (žr. 3 priedėlį).

Sugerties tarpsnis turi trukti 28 paras, jei negalima įrodyti, kad pusiausvyrą pasiekta anksčiau. Jei pastovioji būseną nepasiekama per 28 paras, sugerties tarpsnis turi būti pratęstas, atliekant tolesnius matavimus, kol pasiekama pastovioji būseną, bet ne ilgiau kaip iki 60 parų.

#### 1.8.2.2. Apsivalymo tarpsnio trukmė

Pusės sugerties tarpsnio laiko paprastai pakanka, kad sugertos medžiagos kiekis sumažėtų iki atitinkamos vertės (pvz., 95 %) (žr. 3 priedėlį dėl šio įverčio aiškinimo). Jei laikas, reikalingas 95 % netekimo vertei pasiekti yra neįvykdomai ilgas, pavyzdžiui, du kartus ilgesnis nei normali sugerties tarpsnio trukmė (t. y. daugiau kaip 56 paros), galima naudoti trumpesnę periodą (pvz., kol bandomosios medžiagos koncentracija pasiekia mažiau nei 10 % pastoviosios būsenos koncentracijos). Tačiau medžiagų, kurių sugerties ir apsivalymo modelis yra sudėtingesnis nei tas, kurį vaizduoja žuvų vienoje kameroje modelis, turintis pirmojo laipsnio kinetiką, netekimo greičio konstantoms nustatyti naudojami ilgesni apsivalymo tarpiniai. Tačiau šio periodo trukmę gali apspręsti laikas, kurį bandomosios medžiagos koncentracija žuvyje yra vis dar didesnė nei analizinio aptikimo riba.

#### 1.8.2.3. Bandomųjų žuvų skaičius

Bandomajai koncentracijai parenkamas toks žuvų skaičius, kad kiekvieną bandinio ėmimą bandiniui tektų ne mažiau kaip keturios žuvis. Jei reikia didesnio statistinio reikšmingumo, vienam bandiniui žuvų reikės daugiau.

Jei naudojamos suaugusios žuvis, nurodykite, kokios – vienos lyties žuvis ar abiejų lyčių žuvis – buvo naudojamos bandyme. Jei naudojamos abiejų lyčių žuvis, 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.

Kiekvienam atskiram bandymui parenkamos panašios masės žuvis, kad mažiausių žuvų masė nebūtų mažesnė kaip du trečdaliai didžiausios žuvis masės. Visos žuvis turi būti tų pačių metų ir iš to paties šaltinio. Kadangi kartais paaiškėja, kad žuvų masė ir amžius turi didelę įtaką BKF vertėms (1), šios detalės turi būti tiksliai registruojamos. Norint įvertinti vidutinę masę, rekomenduojama prieš bandymą pasverti atskirą bandinį, paimtą iš turimų žuvų atsargų.

#### 1.8.2.4. Įkrova

Norint mažinti  $C_w$  sumažėjimą dėl žuvų pridėjimo bandymo pradžioje ir išvengti ištirpusio deguonies koncentracijos mažėjimo, naudojami dideli vandens ir žuvų kiekio santykiai. Svarbu, kad įkrovos dydis atitiktų naudojamą bandomąją rūšį. Bet kuriuo atveju paprastai rekomenduojamas įkrovos dydis yra 0,1–1,0 g žuvis (šlapios masės) litrai vandens parai. Dideles įkrovas galima taikyti, jei įrodoma, kad reikiamą bandomosios medžiagos

koncentraciją įmanoma palaikyti  $\pm 20\%$  ribose ir kad ištirpusio deguonies koncentracija netampa mažesnė už  $60\%$  soties koncentracijos.

Pasirenkant tinkamus įkrovos režimus, atsižvelgiama į žuvų rūšies įprastosios gyvenimo aplinkos sąlygas. Pavyzdžiui, dugne gyvenančioms žuvis tam pačiam vandens tūriui gali būti reikalingas didesnis akvariumo dugno plotas nei jūros žuvų rūšims.

#### 1.8.2.5. Maitinimas

Aklimatizavimo ir bandymo laikotarpiu žuvis maitinama tinkamu maistu, kurio žinomas riebalų ir bendrasis baltymų kiekis ir kurio pakanka, kad žuvis būtų sveikos ir būtų palaikoma jų kūno masė. Žuvis aklimatizavimo ir bandymo laikotarpiu maitinama kasdien, pašaro kiekis sudaro maždaug  $1\text{--}2\%$  kūno masės per parą; taip bandymo metu riebalų koncentracija daugumoje žuvų rūšių palaikoma santykinai pastovi. Norint išlaikyti kūno masės ir riebalų kiekio atitikimą, maisto kiekis turi būti perskaičiuotas, pvz., kartą per savaitę. Šiam apskaičiavimui atlikti žuvų masė kiekvienoje kameroje gali būti įvertinta pagal neseniai iš šios kameros bandiniui paimtų žuvų masę. Nesverkite žuvų, kurios lieka kameroje.

Nesuvalgytas maistas ir išmatos kasdien iš kameros išsiurbiami netrukus po maitinimo (nuo 30 minučių iki vienos valandos). Kameros visą bandymo laiką turi būti kuo švaresnės, kad būtų palaikoma kiek įmanoma mažesnė organinių medžiagų koncentracija, nes organinės anglies buvimas gali riboti bandomosios medžiagos biologinį prieinamumą (1).

Kadangi daugelis pašarų gaminama iš žuvies miltų, pašaras turi būti analizuojamas, ieškant bandomosios medžiagos. Taip pat pageidautina analizuoti pašarą pesticidams ir sunkiesiems metalams nustatyti.

#### 1.8.2.6. Šviesa ir temperatūra

Apšvietimo periodo trukmė paprastai lygi  $12\text{--}16$  valandų, o temperatūra ( $\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) turi būti tinkama žuvų rūšims (žr. 2 priedėlį). Turi būti žinomas apšvietimo tipas ir jo charakteristikos. Reikia atkreipti dėmesį į galimą bandomosios medžiagos fotocheminį virsmą tyrimo metu naudoto apšvietimo sąlygomis. Turi būti naudojamas tinkamas apšvietimas, vengiant žuvis veikti gamtoje nesančiais fotocheminio irimo produktais. Kai kuriais atvejais gali būti reikalingas filtras, kuris nepraleistų trumpesnio nei  $290\text{ nm}$  bangos ilgio UV spinduliuotės.

#### 1.8.2.7. Bandomoji koncentracija

Žuvis pratekėjimo sąlygomis veikiama vandenyje bent dvejų koncentracijų bandomąja medžiaga. Paprastai didesnė (arba didžiausia) bandomosios medžiagos koncentracija parenkama taip, kad ji būtų lygi maždaug  $1\%$  jos ūmios asimptotinės  $LC_{50}$  ir būtų bent dešimt kartų didesnė nei jos aptikimo riba vandenyje taikomu analizės metodu.

Didžiausią bandomosios medžiagos koncentraciją taip pat galima nustatyti padalinant ūmios  $96\text{ h } LC_{50}$  vertę iš atitinkamo ūmios ir lėtinės koncentracijų santykio (kai kurių cheminių medžiagų atitinkamas santykis gali keistis maždaug nuo  $3$  iki  $100$ ). Jei galima, pasirinkite kitokią koncentraciją (-as), kuri būtų didesnė už nurodytą  $10$  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  $^{14}\text{C}$  žymėtą bandomąją medžiagą. Neturi būti naudojama koncentracija, kuri būtų didesnė nei bandomosios medžiagos tirpumas.

Jei naudojama tirpinimo medžiaga, jos koncentracija turi būti ne didesnė kaip  $0,1\text{ ml/l}$  ir ji turi būti vienoda visuose bandymo induose. Turi būti žinoma, kokią bendrosios organinės anglies kiekio bandymo vandenyje dalį kartu sudaro ši medžiaga ir bandomoji medžiaga. Tačiau reikia dėti visas pastangas, kad tokių medžiagų naudoti nereikėtų.

#### 1.8.2.8. Kontroliniai bandymai

Papildomai bandymo bandinių serijai turi būti atliekamas skiedimo vandens tikrinimas arba, jei tinka, vandens su tirpinimo medžiaga tikrinimas, jei buvo nustatyta, kad tirpinimo medžiaga neveikia žuvų. Jei taip nėra, turi būti atliekami abu kontroliniai bandymai.

#### 1.8.3. Vandens kokybės matavimų dažnis

Bandymo metu visuose induose būtina matuoti ištirpusį deguonį, TOC, pH ir temperatūrą. Bendrasis kietumas ir sūrumas, jei tinka, turi būti nustatyti kontroliniuose bandiniuose ir viename inde su didesne (arba didžiausia) koncentracija. Turi būti nustatomas bent jau ištirpęs deguonis ir sūrumas, jei tinka, ir tai daroma tris kartus – suger ties tarpinio pradžioje, maždaug per vidurį ir pabaigoje, o apšvalymo laikotarpiu – kartą per savaitę. TOC turi



būti nustatyta bandymo pradžioje (24 valandos ir 48 valandos prieš pradėdant sugerties tarpinį) prieš žuvų pridėjimą ir bent kartą per savaitę sugerties iš apšalymo tarpinių 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.

#### 1.8.4. Bandinių ėmimas ir žuvų bei vandens analizė

##### 1.8.4.1. Žuvies ir vandens bandinio ėmimo grafikas

Vanduo iš bandymo kamerų bandomosios medžiagos koncentracijai nustatyti imamas prieš žuvų pridėjimą ir sugerties bei apšalymo tarpinių metu. Mažiausiai vandens bandinys imamas tuo pačiu metu kaip ir žuvies bandinys ir dar prieš maitinimą. Sugerties tarpinio metu bandomosios medžiagos koncentracija nustatoma tikrinant atitiktą patikimumo kriterijams.

Žuvų bandinys imamas bent penkis kartus sugerties tarpinio metu ir bent keturis kartus apšalymo tarpinio metu. Kadangi, remiantis tokiu bandinių skaičiumi, kai kuriais atvejais bus sunku gauti pakankamai tikslų BKF vertės įvertį, ypač kai pasirodo, kad apšalymo kinetika nėra pirmojo laipsnio, galima būtų patarti abiem tarpniais bandinius imti dažniau (žr. 4 priedėlį). Papildomi bandiniai dedami saugoti ir analizuojami tik tuo atveju, jei pasirodo, kad pirmosios eilės analizės duomenų nepakanka BKF apskaičiuoti norimu tikslumu.

Tinkamo bandinių ėmimo grafiko pavyzdys pateiktas 4 priedėlyje. Naudojant kitas  $P_{ow}$  numanomas vertes veikimo laikui, per kurį būtų pasiekta 95 % sugerties, apskaičiuoti, gali būti lengvai sudaryti kiti grafikai.

Bandinių ėmimas sugerties tarpinio metu tęsiamas tol, kol pasiekama pastovioji būseną, bet ne ilgiau kaip 28 paras. Jei pastovioji būseną nebuvo pasiekta per 28 paras, bandinių ėmimas tęsiamas toliau, kol pasiekama pastovioji būseną, bet ne ilgiau kaip iki 60 parų. Prieš pradėdant apšalymo tarpinį, žuvys pernešamos į švairius rezervuarus.

##### 1.8.4.2. Bandinių ėmimas ir bandinio ruošimas

Vandens bandiniai analizei gaunami, pvz., siurbiant juos vamzdžiais iš inertiškos medžiagos, įstatytais į bandymo kameros vidurį. Kadangi įrodyta, kad filtravimas ir centrifugavimas ne visuomet leidžia atskirti bandomosios medžiagos biologiškai neišsavinamą 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 tokiomis būdais negalima apdoroti.

Vietoj to reikia imtis priemonių, kad rezervuarai būtų kiek įmanoma švaresni, o bendrosios organinės anglies kiekis sugerties ir apšalymo tarpinių metu turi būti nuolat kontroliuojamas.

Per kiekvieną bandinio ėmimą iš bandymo kameros paimamas atitinkamas žuvų skaičius (paprastai ne mažiau kaip keturios žuvys). Bandinio žuvys iš karto nuplaunamos vandeniu, „sausinamos“ filtravimo popieriumi, tuojau pat numarinamos pačiu tinkamiausiu ir humaniškesniu 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 apšalymo greičius bandymo eigoje. Iš karto atlikta analizė taip pat leidžia nevēluojant nustatyti, kada pasiekama horizontalioji sugerties kreivės dalis.

Jei iš karto analizė neatliekama, bandiniai laikomi tinkamu būdu. Prieš pradėdant tyrimą gaunama informacija apie tinkamą konkrečios bandomosios medžiagos laikymo metodą, pvz., užšaldymą, laikymą 4 °C temperatūroje, laikymo trukmę, ekstrahavimą ir t. t.

##### 1.8.4.3. Analizės metodo kokybė

Kadangi visa bandymo procedūra iš esmės priklauso nuo bandomajai medžiagai nustatyti taikomo analizės metodo tikslumo, preciziškumo ir jautrumo, eksperimentiškai patikrinkite, ar konkretaus metodo cheminės analizės preciziškumas ir atkuriamumas, taip pat bandomosios medžiagos regeneravimas iš vandens ir žuvies yra pakankami. Taip pat patikrinkite, kad bandomoji medžiaga nebūtų aptinkama naudojant skiedimo vandenį.



Jei būtina, bandyme gautoms  $C_w$  ir  $C_f$  vertės koreguojamos atsižvelgiant į regeneravimo ir fono kontroliniuose bandiniuose gautas vertes. Su žuvies ir vandens bandiniais visą laiką elgiamasi taip, kad užteršimas ir nuostoliai (pvz., dėl bandinio ėmimo įtaiso adsorbcijos) būtų kuo mažesni.

#### 1.8.4.4. Žuvies bandinio analizė

Jei bandyme naudojamos žymėtuosius atomus turinčios medžiagos, galima nustatyti bendrą jų kiekį (t. y. pradinę medžiagą ir metabolitus) arba bandiniai gali būti gryninami, kad pradinę medžiagą galima būtų analizuoti atskirai. Taip pat pasiekus pastoviąją būseną arba sugerties tarpsnio pabaigą (kas anksčiau) galima apibūdinti pagrindinius metabolitus. Jei BKF, apskaičiuotas pagal bendrąjį žymėtuosius atomus turinčių likučių kiekį, yra  $\geq 1\ 000\ %$ , būtų patartina, o kai kurių cheminių medžiagų kategorijų, pvz., pesticidų, atveju labai rekomenduotina, identifikuoti ir kiekybiškai nustatyti irimo produktus, kurie sudaro  $\geq 10\ %$  bendrojo likučių kiekio žuvies audiniuose pastoviosios būsenos sąlygomis. Jei yra identifikuoti ir kiekybiškai nustatyti irimo produktai, kurie sudaro  $\geq 10\ %$  bendrojo žymėtuosius atomus turinčių likučių kiekio žuvies audiniuose, taip pat rekomenduojama identifikuoti ir kiekybiškai nustatyti irimo produktus bandymo vandenyje.

Bandomosios medžiagos koncentracija paprastai turi būti nustatoma kiekvienoje pasvertose atskiroje žuvyje. Jei tai neįmanoma, kiekvieno bandinio ėmimo metu bandinius galima jungti, tačiau bandinių jungimas riboja statistines metodikas, kurios galėtų būti taikomos duomenims apdoroti. Jei svarbi yra specifinė statistinė metodika ir jos statistinis reikšmingumas, tuomet bandyme turi būti naudojamas pakankamas žuvų skaičius, kuris atitiktų norimą bandinių jungimo metodiką ir statistinį reikšmingumą (6) (7).

BKF turi būti išreikštas kaip visos šlapios masės funkcija, o labai lipofiliškoms medžiagoms – kaip riebalų kiekio funkcija. Riebalų kiekis žuvyje nustatomas kiekvieno bandinio ėmimo metu, jei tai įmanoma. Riebalų kiekiui nustatyti turi būti taikomi tinkami metodai (3 priedėlio 8 ir 2 nuorodos). Etaloniniu metodu gali būti rekomenduota ekstrahavimo chloroformo ir metanolio mišiniu metodika (9). Įvairiais metodais gaunamos nevienodos vertės (10), todėl svarbu pateikti taikyto metodo detales. Kai tai įmanoma, turi būti atliekama to paties ekstrakto, kuris buvo gautas bandomajai medžiagai analizuoti, riebalų analizė, kadangi riebalus dažnai reikia pašalinti iš ekstrakto prieš jį analizuojant chromatografiškai. Riebalų kiekis žuvyje (mg/kg šlapios masės) bandymo pabaigoje turi nesiskirti nuo bandymo pradžioje nustatyto kiekio daugiau kaip  $\pm 25\ %$ . Taip pat reikia pateikti procentais apskaičiuotą sausos audinio medžiagos kiekį, kad riebalų koncentraciją būtų galima apskaičiuoti sausos medžiagos kiekiui.

## 2. DUOMENYS

### 2.1. REZULTATŲ APDOROJIMAS

Bandomosios medžiagos sugerties kreivė gaunama aritmetinėje skalėje brėžiant sugerties tarpsnio metu gautos koncentracijos žuvyje arba jos paviršiuje (arba nustatytuose audiniuose) kitimą laike. Jei kreivė pasiekė horizontaliąją dalį, t. y. pasidaro beveik asimptotiška laiko ašiai, pastoviosios būsenos  $BKF_{NB}$  apskaičiuojamas taip:

$$\left( \frac{C_f(\text{pastovioji būsena})(\text{vidutinė vertė})}{C_w(\text{pastovioji būsena})(\text{vidutinė vertė})} \right)$$

Kai pastovioji būsena nepasiekama,  $BKF_{NB}$  pakankamu pavojui įvertinti tikslumu gali būti įmanoma apskaičiuoti pagal  $80\ % (1,6/k_2)$  arba  $95\ % (3,0/k_2)$  „pastoviosios būsenos“ pusiausvyros.

Taip pat nustatomas koncentravimo faktorius ( $BKF_K$ ), kaip dviejų pirmojo laipsnio kinetinių konstantų  $k_1/k_2$  santykis. Apsivalymo greičio konstanta ( $k_2$ ) paprastai nustatoma pagal apsivalymo kreivę (t. y. bandomosios medžiagos žuvyje koncentracijos mažėjimo laike grafiką). Tuomet, turint  $k_2$  vertę ir  $C_f$ , 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 parametrų vertinimo metodų taikymas panaudojant kompiuterį (11). Kitaip  $k_1$  ir  $k_2$  apskaičiuoti gali būti naudojami grafiniai metodai. Jei apsivalymo kreivė akivaizdžiai yra ne pirmojo laipsnio, turi būti taikomi sudėtingesni modeliai (žr. 3 priedėlio nuorodas) ir prašoma biologinės statistikos specialisto patarimo.

### 2.3. REZULTATŲ AIŠKINIMAS

Rezultatai turi būti aiškinami atsargiai, jei išmatuotos bandomųjų tirpalų koncentracijos yra arti analizinio metodo aptikimo ribos.

Aiškiai apibrėžtos sugerties ir apsivalymo kreivės yra biologinio koncentravimo duomenų geros kokybės ženklas. Dviejų bandomųjų koncentracijų sugerties (apsivalymo) konstantų kitimas turi būti mažesnis kaip 20 %. Stebėti dviejų naudojamų bandomųjų koncentracijų dideli sugerties (apsivalymo) greičių skirtumai turi būti registruojami ir pateikti galimi aiškinimai. Dažniausiai gerai suplanuotuose tyrimuose BKF verčių pasiklyvimo riba artėja prie  $\pm 20\%$ .

### 3. ATASKAITA

Bandymo ataskaita turi apimti tokią informaciją:

#### 3.1. BANDOMOJI MEDŽIAGA:

- fizikinė prigimtis ir, jei tinka, fizikinės ir cheminės savybės,
- cheminio identifikavimo duomenys (įskaitant organinės anglies kiekį, jei tinka),
- jei turi žymėtųjų atomų, tiksli žymėtojo (-ų) atomo (-ų) padėtis ir su priemaišomis siejamo radioaktyvumo procentinė dalis.

#### 3.2. BANDOMOSIOS RŪŠYS

- mokslinis pavadinimas, rūšis, šaltinis, bet koks išankstinis apdorojimas, aklimatizavimas, amžius, dydžio intervalas ir t. t.

#### 3.3. BANDYMO SĄLYGOS:

- naudota bandymo metodika (pvz., dinaminis bandymas arba bandymas pusiau stacionariomis sąlygomis),
- naudoto apšvietimo tipas ir charakteristikos bei apšvietimo periodas (-ai),
- bandymo schema (pvz., bandymo kamerų skaičius ir dydis, vandens tūrio pasikeitimo sparta, lygiagrečių bandymų skaičius, žuvų skaičius lygiagrečiame bandyme, bandyme naudotų koncentracijų skaičius, sugerties ir apsivalymo tarpsnių trukmė, žuvų ir vandens bandinių ėmimo dažnis),
- pradinių tirpalų ruošimo metodas ir jų keitimo dažnis (jei naudojama tirpinimo medžiaga, turi būti nurodyta jos koncentracija ir dėl jos susidaręs organinės anglies kiekis bandymo vandenyje),
- vardinės bandomosios koncentracijos, bandymo rezervuaruose nustatytų koncentracijų vidutinės vertės ir jų standartiniai nuokrypiai bei metodas, kuriuo jie buvo nustatyti,
- skiedimo vandens šaltinis, bet kokio jo apdorojimo aprašymas, bandomųjų žuvų galimybių gyventi vandenyje įrodymo rezultatai ir vandens charakteristikos: pH, kietumas, temperatūra, ištirpusio deguonies koncentracija, liekamojo chloro lygiai (jei matuoti), bendroji organinė anglis, suspenduotos kietosios dalelės, bandomosios terpės sūrumas (jei tinka) ir visi kiti daryti matavimai,
- vandens kokybė bandymo rezervuaruose, pH, kietumas, TOC, temperatūra ir ištirpusio deguonies koncentracija,
- detali informacija apie maitinimą (pvz., maisto tipas, šaltinis, sudėtis (bent riebalų ir baltymų kiekis, jei įmanoma) duodamas kiekis ir maitinimo dažnis),
- informacija apie žuvų ir vandens bandinių apdorojimą, įskaitant ruošimo, laikymo, ekstrahavimo detales ir bandomosios medžiagos bei riebalų (jei nustatomi) analizės metodikas (ir preciziškumą).

## 3.4. REZULTATAI:

- bet kokių atliktų išankstinių tyrimų rezultatai,
- kontrolinių žuvų ir žuvų kiekvienoje veikimo kameroje gaisamumas bei bet koks jų neįprastas elgesys,
- riebalų kiekis žuvyje (jei nustatyta atliekant bandymą),
- kreivės (įskaitant visus matavimuose gautus duomenis), rodančios bandomosios medžiagos sugertį žuvis, jų apsisvalymą ir laiką iki pastoviosios būsenos,
- Cf ir Cw (ir jų standartinis nuokrypis bei intervalas, jei tinka) visiems bandinio ėmimo atvejams (Cf išreikšta  $\mu\text{g/g}$  viso kūno arba tam tikrų jo audinių, pvz., riebalų, šlapios masės (ppm), o Cw –  $\mu\text{g/ml}$  (ppm)). Cw vertės kontrolinių bandymų serijose (taip pat turi būti nurodytas fonas),
- pastoviosios būsenos biologinio koncentravimo faktorius ( $\text{BKF}_{\text{NB}}$ ) ir (arba) kinetinis koncentravimo faktorius ( $\text{BKF}_{\text{K}}$ ) ir, jei taikytina, 95 % pasiklovimo ribos sugerties ir apsisvalymo (netekimo) greičio konstantoms (viskas apskaičiuota viso gyvūno kūno ir bendro riebalų kiekio, jei nustatytas, arba tam tikrų jo audinių atžvilgiu), pasiklovimo ribos ir standartinis nuokrypis (kai yra) bei apskaičiavimo (duomenų analizės) metodai kiekvienai naudotos bandomosios medžiagos koncentracijai,
- jei naudojamos žymėtuosius atomus turinčios medžiagos ir jei to reikia, gali būti pateikti bet kokių aptiktų metabolitų kaupimosi rezultatai,
- visa, kas bandyme buvo neįprasto, bet koks nukrypimas nuo šių metodikų ir bet kuri kita susijusi informacija.

Mažinkite rezultatų, kurie būtų „nenustatyti aptikimo riboje“, kiekį, kurdami išankstinio bandymo metodus ir vykdydami bandymų planavimą, kadangi tokie rezultatai negali būti panaudoti greičio konstantoms apskaičiuoti.

## 4. NUORODOS

- 1) Connell D.W. (1988). Bioaccumulation behaviour of persistent chemicals with aquatic organisms. Rev. Environ. Contam. Toxicol. 102, p. 117–156.
- 2) Bintein S., Devillers J. and Karcher W. (1993). Nonlinear dependence of fish bioconcentration on n-octanol/water partition coefficient. SAR and QSAR in Environmental Research, 1, 29–390.
- 3) OECD, Paris (1996). Direct Phototransformation of chemicals in water. Environmental Health and SAFETY Guidance Document Series on Testing and Assessment of Chemicals. No. 3.
- 4) Kristensen P. (1991) Bioconcentration in fish: Comparison of bioconcentration factors derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate organic matter to the bioavailability of chemicals. Water Quality Institute, Denmark.
- 5) US EPA 822-R-94-002 (1994) Great Lake Water Quality Initiative Technical Support Document for the Procedure to Determine Bioaccumulation Factors. July 1994.
- 6) US FDA, (Food and Drug Administration) Revision. Pesticide analytical manual, 1, 5600 Fisher's Lane, Rockville, MD 20852, July 1975.
- 7) US EPA (1974). Section 5, A(l) Analysis of Human or Animal Adipose Tissue, in Analysis of Pesticide Residues in Human and Environmental Samples, Thompson J.F. (ed.) Research Triangle Park, N.C. 27711.

- 8) Compaan H. (1980) in „The determination of the possible effects of chemicals and wastes on the aquatic environment: degradation, toxicity, bioaccumulation“ Ch. 2.3, Part II. Government Publishing Office, the Hague, The Netherlands.
- 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.

## 1 priedėlis

## Skiedimui tinkamo vandens cheminės savybės

	Medžiaga	Didžiausia koncentracija
1	Kietosios dalelės	5 mg/l
2	Bendroji organinė anglis	2 mg/l
3	Nejonizuotas amoniakas	1 µg/l
4	Liekamasis chloras	10 µg/l
5	Bendras fosforo organinių pesticidų kiekis	50 ng/l
6	Bendras chloro organinių pesticidų ir polichlorintų bifenilų kiekis	50 ng/l
7	Bendras organinis chloras	25 ng/l
8	Aliuminis	1 µg/l
9	Arsenas	1 µg/l
10	Chromas	1 µg/l
11	Kobaltas	1 µg/l
12	Varis	1 µg/l
13	Geležis	1 µg/l
14	Švinas	1 µg/l
15	Nikelis	1 µg/l
16	Cinkas	1 µg/l
17	Kadmis	100 ng/l
18	Gyvsidabris	100 ng/l
19	Sidabras	100 ng/l

## 2 priedėlis

## Bandymui rekomenduojamos žuvų rūšys

	Rekomenduojamos rūšys	Rekomenduojamas bandymo temperatūros intervalas (°C)	Rekomenduojamas bandomojo gyvūno bendras ilgis (cm)
1	<i>Danio rerio</i> <sup>(1)</sup> ( <i>Teleostei, Cyprinidae</i> ) (Hamilton-Buchanan) Zebrinė danija	20–25	3,0 ± 0,5
2	<i>Pimephales promelas</i> ( <i>Teleostei, Cyprinidae</i> ) ( <i>Rafinesque</i> ) Juodoji drūtgalvė rainė	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	<i>Oryzias latipes</i> ( <i>Teleostei, Poeciliidae</i> ) (Temminck ir Schlegel) Japoninė medaka	20–25	4,0 ± 1,0
5	<i>Poecilia reticulata</i> ( <i>Teleostei, Poeciliidae</i> ) (Peters) Paprastasis gupis	20–25	3,0 ± 1,0
6	<i>Lepomis macrochirus</i> ( <i>Teleostei, Centrarchidae</i> ) ( <i>Rafinesque</i> ) Melsvažiaunio saulešeris	20–25	5,0 ± 2,0
7	<i>Oncorhynchus mykiss</i> ( <i>Teleostei, Salmonidae</i> ) ( <i>Walbaum</i> ) Vaivorykštinis 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

(<sup>1</sup>) Meyer A., Orti G. (1993) Proc. Royal Society of London, Series B., Vol 252, p. 231.

Skirtingose šalyse naudojamos įvairios upių žiočių ir jūros žuvų rūšys, pvz.:

Spotas	<i>Leiostomus xanthurus</i>
Lėlžuvė	<i>Cyprinodon variegatus</i>
Priekrantinė menidija	<i>Menidia beryllina</i>
Gyvavedis šaineris	<i>Cymatogaster aggregata</i>
Kalifornijos jūrų liežuvis	<i>Parophrys vetulus</i>
Siauragalvė plernė	<i>Leptocottus armatus</i>
Trispyglė dyglė	<i>Gasterosteus aculeatus</i>
Paprastasis vilkešeris	<i>Dicentrarchus labrax</i>
Paprastoji aukšlė	<i>Alburnus alburnus</i>

## Rinkimas

Lentelėje nurodytas gėlyjū vandenų žuvis lengva auginti ir (arba) jų galima gauti ištisus metus, tuo tarpu galimybė gauti jūros ir upių žiočių žuvų iš dalies apsiriboja atitinkamomis šalimis. Žuvis galima auginti ir veisti žuvų fermose arba laboratorijoje ligų ir parazitų kontrolės sąlygomis, kad bandomieji gyvūnai būtų sveiki ir būtų žinoma jų kilmė. Šių žuvų yra daugelyje pasaulio kraštų.

## 3 priedėlis

## Sugerties ir apsivalymo tarpsnių trukmės prognozavimas

## 1. Sugerties tarpsnio trukmės prognozavimas

Prieš atliekant bandymą,  $k_2$  įvertis, taigi, pastoviai būsenai pasiekti reikalingo laiko tam tikra procentinė dalis, gali būti gauta iš empirinių priklausomybių tarp  $k_2$  ir pasiskirstymo koeficiento (n-oktanolis/vanduo) ( $P_{ow}$ ) arba  $k_2$  ir tirpumo vandenyje ( $s$ ).

$k_2$  ( $\text{para}^{-1}$ ) 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).

Pastoviai būsenai pasiekti reikalingo laiko tam tikra procentinė dalis, taikant  $k_2$  įvertį, gali būti nustatyta iš bendrosios kinetinės lygties, aprašančios sugertį ir apsivalymą (pirmojo laipsnio kinetika):

$$\left( \frac{dC_f}{dt} \right) = (k_1 \cdot C_w - k_2 \cdot C_f)$$

arba, jei  $C_w$  yra pastovus dydis:

$$C_f = \left( \frac{k_1}{k_2} \right) \cdot C_w (1 - e^{-k_2 t}) \quad (3 \text{ lygtis})$$

Artėjant prie pastoviosios būsenos ( $t \rightarrow \infty$ ), 3 lygtis gali būti supaprastinta (5) (6) iki:

$$C_f = \left( \frac{k_1}{k_2} \right) \cdot C_w \text{ arba } C_f/C_w = k_1/k_2 = BCF$$

Tokiu atveju,  $k_1/k_2 \cdot C_w$  yra arti koncentracijos žuvyje „pastoviosios būsenos“ sąlygomis ( $C_{f,s}$ ).

3 lygtis gali būti pertvarkyta į

$$C_f = (C_{f,s}(1 - e^{-k_2 t})) \text{ arba } \left( \frac{C_f}{C_{f,s}} \right) = (1 - e^{-k_2 t}) \quad (4 \text{ lygtis})$$

Taikant 4 lygtį, galima prognozuoti laiką, reikalingą pasiekti tam tikrą pastoviosios būsenos procentinę dalį, kai pagal 1 arba 2 lygtį iš anksto yra įvertinta  $k_2$ .

Statistiškai priimtiniams duomenims ( $BKF_k$ ) gauti statistiškai optimalios sugerties tarpsnio trukmės atskaitos tašku laikomas laikas, per kurį kreivė, vaizduojanti priklausomybę tarp bandomosios medžiagos žuvyje koncentracijos logaritmo ir tiesinėje skalėje atidėto laiko, pasiektų jos vidurio tašką arba  $1,6/k_2$ , arba 80 % pastoviosios būsenos, tačiau ne didesnis kaip  $3,0/k_2$ , arba 95 % pastoviosios būsenos (7).

Laikas 80 % pastoviosios būsenos pasiekti yra lygus (4 lygtis):

$$0,80 = 1 - e^{-k_2 t_{80}} \text{ arba } t_{80} = \left( \frac{(1,6)}{(k_2)} \right) \quad (5 \text{ lygtis})$$

Panašiu būdu, laikas 95 % pastoviosios būsenos pasiekti yra lygus:

$$t_{95} = \left( \frac{(3,0)}{(k_2)} \right) \quad (6 \text{ lygtis})$$

Pvz., sugerties tarpsnio trukmė (sug) bandomajai medžiagai, kurios  $\log P_{ow} = 4$ , būtų (taikant lygtis 1, 5 ir 6):

$$\log_{10} k_2 = -0,414 \cdot (4) + 1,47 \quad k_2 = 0,652 \text{ paros}^{-1}$$

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 bandomosios medžiagos  $s = 10^{-5} \text{ mol/l}$  ( $\log(s) = -5,0$ ), sug trukmė būtų (taikant lygtis 1,2, 5 ir 6):

$$\log_{10} (P_{ow}) = -0,862 (-5,0) + 0,710 = 5,02$$

$$\log_{10} k_2 = -0,414 (5,02) + 1,47$$

$$k_2 = 0,246 \text{ paros}^{-1}$$

sug (80 %) =  $1,6/0,246$ , t. y. 6,5 paros (156 valandos)

arba sug (95 %) =  $3,0/0,246$ , t. y. 12,2 paros (293 valandos)

Kaip alternatyva, lygtis:

$$T_{eq} = 6,54 \times 10^3 P_{ow} + 55,31 \text{ (valandos)}$$

gali būti naudojama apskaičiuoti laiką, reikalingą tikrajai pastovijai būsenai pasiekti (4).

## 2. Apsivalymo tarpsnio trukmės prognozavimas

Laikas, per kurį organizme sulaikytos medžiagos kiekis sumažėja iki tam tikros pradinės koncentracijos procentinės dalies, taip pat gali būti prognozuojamas, taikant bendrąją lygtį, kuri aprašo sugertį ir apsivalymą (pirmojo laipsnio kinetika) (1) (8).

Apsivalymo tarpsnio atveju daroma prielaida, kad  $C_w$  lygi nuliui. Lygtis gali būti paversta į lygtį:

$$\left( \frac{dC_f}{dt} \right) = (-k_2 C_f) \text{ arba } C_f = (C_{f,0} \cdot e^{-k_2 t})$$

kurioje  $C_{f,0}$  yra koncentracija apsivalymo tarpsnio pradžioje. Tuomet 50 % apsivalymas bus pasiektas per laiką ( $t_{50}$ ):

$$\left( \frac{C_f}{C_{f,0}} \right) = \left( \frac{(1)}{(2)} \right) = (e^{-k_2 t_{50}}) \text{ arba } t_{50} = \left( \frac{(0,693)}{(k_2)} \right)$$



Panašiai, 95 % apsisvalymas bus pasiektas per laiką:

$$t_{95} = \left( \frac{(3,0)}{(k_2)} \right)$$

Jei pirmajam periodui naudojama sugerties trukmė sudaro 80 % ( $1,6/k_2$ ), o apsisvalymo tarpsnyje sumažėjimas sudaro 95 % ( $3,0/k_2$ ), tuomet apsisvalymo tarpsnis trunka maždaug du kartus ilgiau nei sugerties tarpsnis.

Tačiau svarbu pažymėti, kad įverčiai remiasi prielaida, kad sugerties ir apsisvalymo modeliai atitinka pirmojo laipsnio kinetiką. Jei pirmojo laipsnio kinetikos akivaizdžiai nepaisoma, turi būti naudojami sudėtingesni modeliai (pvz., (1) nuoroda).

### Nuorodos (3 priedėlio)

- 1) Spacie A. and Hamelink J.L. (1982). Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. *Environ. Toxicol. and Chem.* 1, p. 309–320.
- 2) Kristensen P. (1991). Bioconcentration in fish: comparison of BCFs derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate matter to the bioavailability of chemicals. Danish Water Quality Institute.
- 3) Chiou C.T. and Schmedding D.W. (1982). Partitioning of organic compounds in octanol-water systems. *Environ. Sci. Technol.* 16 (1), pp. 4–10.
- 4) Hawker D.W. and Connell D.W. (1988). Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on 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 Sauerhof 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) Kōnemann H. and Van Leeuwen K. (1980). Toxicokinetics in fish: Accumulation and Elimination of six Chlorobenzenes by Guppies. *Chemosphere*, 9, p. 3–19.

## 4 priedėlis

Bandinių ėmimo tiriant medžiagų, kurių  $\log P_{ow} = 4$ , Biologinį koncentravimą, grafiko teorinis pavyzdys

Žuvų bandinių ėmimas	Bandinių ėmimo tvarkaraštis		Vandens bandinių skaičius	Žuvų skaičius bandinyje
	Mažiausias reikalingas dažnis (paros)	Papildomas bandinių ėmimas		
Sugerties tarpsnis	-1		2 (*)	Pridėti 45–80 žuvų
	0		2	
1-asis	0,3	0,4	2 (2)	4 (4)
2-asis	0,6	0,9	2 (2)	4 (4)
3-asis	1,2	1,7	2 (2)	4 (4)
4-asis	2,4	3,3	2 (2)	4 (4)
5-asis	4,7		2	6
Apsivalymo tarpsnis				Pernešti žuvis į vandenį be bandomosios medžiagos
6-asis	5,0	5,3		4 (4)
7-asis	5,9	7,0		4 (4)
8-asis	9,3	11,2		4 (4)
9-asis	14,0	17,5		6 (4)

(\*) Vandens bandinys imamas po to, kai buvo patiekti mažiausiai trys „kameros tūriai“.

Pastaba: Prieš bandymą darytas  $k_2$  įvertis, kai  $\log P_{ow} = 4,0$ , yra  $0,652 \text{ paros}^{-1}$ . Bendra bandymo trukmė nustatyta  $3 \times \text{sug} = 3 \times 4,6 \text{ paros}$ , t. y. 14 parų. Kaip vertinti „sug“, žr. 3 priedėlių.“

Vertės skliausteliuose rodo bandinių (vandens, žuvų) skaičių, kurį reikia paimti, jei daromas papildomas bandinių ėmimas.

## 5 priedėlis

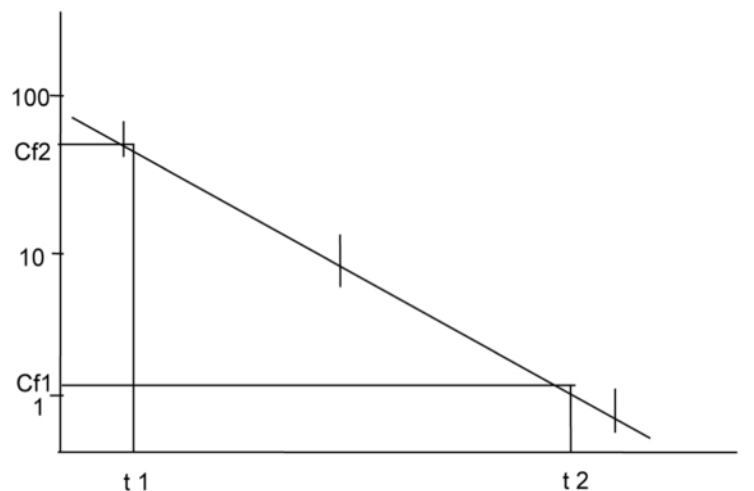
**Modelio pasirinkimas**

Buvo padaryta prielaida, kad biologinio koncentravimo duomenys „pakankamai“ gerai aprašomi paprasto dviejų kamerų ir dviejų parametru modelio, ką rodo ištiesinta kreivė, apksimuojanti koncentracijos žuvyje apšvalymo tarpsnio metu taškus, kai jie vaizduojami pusiau logaritminiame popieriuje. (Jei šie taškai negali būti aprašyti ištiesinta kreive, tuomet reikia naudoti sudėtingesnius modelius, žr. pvz., Spacie ir Hamelink, 3 priedėlio 1 nuoroda).

**Grafinis metodas apšvalymo (netekimo) greičio konstantai  $k_2$  nustatyti**

Pusiau logaritminiame popieriuje nubraižykite kiekviename žuvies bandinyje rastos bandomosios medžiagos koncentracijos kitimo laike grafiką. Šios tiesės krypties koeficientas yra  $k_2$ .

$$k_2 = \frac{\ln(C_{f1}/C_{f2})}{(t_2 - t_1)}$$



Atkreipkite dėmesį, kad nukrypimai nuo tiesės gali reikšti, kad apšvalymo modelis yra sudėtingesnis, nei pirmojo laipsnio kinetika. Norint spręsti apie tai, ar apšvalymo 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:

$$k_1 = \frac{(C_f k_2)}{(C_w \times (1 - e^{-k_2 t}))} \quad (1 \text{ lygtis})$$

$C_f$  vertė nustatoma pagal lygios sugerties kreivės, nubrėžtos remiantis gautais duomenimis, kai braižoma log koncentracijos priklausomybė nuo laiko (aritmetinėje skalėje), vidurio tašką.

**Kompiuteriniai metodai sugerties ir apšvalymo (netekimo) greičio konstantoms apskaičiuoti**

Geriausia priemonė biologinio koncentravimo faktoriui ir  $k_1$  bei  $k_2$  greičio konstantoms apskaičiuoti yra netiesinių parametru vertinimo metodų taikymas panaudojant kompiuterį. Jei duota koncentracijos kitimo laike duomenų aibė ir modelis, šios programos apskaičiuoja  $k_1$  ir  $k_2$  vertes:

$$C_f = C_w \cdot \left( \frac{k_1}{k_2} \right) \times (1 - e^{-k_2 t}) \quad 0 < t < t_c \quad (2 \text{ lygtis})$$

$$C_f = C_w \cdot \left( \frac{k_1}{k_2} \right) \times \left( e^{-k_2(t-t_c)} - e^{-k_1 t} \right) \quad t > t_c \quad (3 \text{ lygtis})$$

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  $k_1$ .

## C.14. ŽUVŲ MAILIAUS AUGIMO BANDYMAS

## 1. METODAS

Šis toksikiškumo augimui bandymo metodas yra OECD TG 215 (2000) kopija.

## 1.1. ĮVADAS

Šis bandymas skirtas įvertinti ilgo veikimo cheminėmis medžiagomis poveikį žuvų mailiaus augimui. Jis pagrįstas Europos Sąjungoje sukurtu ir tarplaboratoriniais bandymais patikrintu (1) (3) dinaminio metodu, taikytu įvertinti cheminių medžiagų poveikį vaivorykštinio upėtakio (*Oncorhynchus mykiss*) mailiaus augimui. Galima naudoti kitais dokumentais tinkamai patvirtintas rūšis. Pvz., įgyta patirties atliekant zebrinės danijos (*Danio rerio*)<sup>(1)</sup> (3) (4) ir japoninės medakos (*medaka*, *Oryzias latipes*) (5) (6) (7) augimo bandymus.

Žr. taip pat C dalies bendrąjį įvadą.

## 1.2. APIBRĖŽTYS

**Mažiausia pastebimą poveikį sukelianti koncentracija (LOEC)** – mažiausia bandomosios medžiagos koncentracija, kuriai esant medžiaga turi didelį poveikį ( $p < 0,05$ ) lyginant su kontroliniais bandiniais. Tačiau visų didesnių kaip LOEC bandomųjų koncentracijų kenksmingas poveikis turi būti lygus ar didesnis už LOEC poveikį.

**Nepastebėto poveikio koncentracija (NOEC)** – bent kiek už LOEC mažesnė bandomoji koncentracija.

**EC<sub>x</sub>** – šiame bandyme tai bandomosios medžiagos koncentracija, kuriai esant žuvų augimo greičio pokytis lyginant su kontroliniais bandiniais yra x %.

**Įkrova** – gyvų žuvų masė, tenkanti vandens tūrio vienetai.

**Žuvų tankis** – žuvų skaičius, tenkantis vandens tūrio vienetai.

**Atskiros žuvies savitasis augimo greitis** išreiškia atskiros žuvies augimo greitį pagal jos pradinę masę.

**Vidutinis savitasis augimo greitis rezervuare** išreiškia rezervuaro populiacijos vidutinį augimo greitį esant vienai koncentracijai.

**„Pseudo“ savitasis augimo greitis** išreiškia atskirų žuvų augimo greitį lyginant su rezervuaro populiacijos vidutine pradine mase.

## 1.3. BANDYMO METODO PRINCIPAS

Eksponentinio augimo tarpsnio žuvų mailius pasveriamas, dedamas į bandymo kameras, kur jis geriau dinaminio bandymo sąlygomis ar, jei neįmanoma, atitinkamomis pusiau statinio bandymo (periodinio atnaujinimo) sąlygomis yra veikiamas bandomosios medžiagos subletalios koncentracijos intervalo vandeniniais tirpalais. Bandymo trukmė 28 paros. Žuvis maitinama kasdien. Maisto norma nustatoma pagal pradinę žuvų masę ir po 14 parų gali būti apskaičiuojama iš naujo. Bandymo pabaigoje žuvis vėl sveriamos. Taikant regresijos modelį analizuojamas poveikis augimo greičiui norint nustatyti koncentraciją, sukeliančią x % augimo greičio pokytį, t y. EC<sub>x</sub> (pvz., EC<sub>10</sub>, EC<sub>20</sub> ar EC<sub>30</sub>). Be to, mažiausiai pastebimą poveikį sukeliančiai koncentracijai (LOEC), taigi ir nepastebėto poveikio koncentracijai (NOEC) nustatyti duomenis galima lyginti su kontrolinių bandinių vertėmis.

## 1.4. INFORMACIJA APIE BANDOMĄJĄ MEDŽIAGĄ

Reikėtų turėti ūmaus toksikiškumo bandymo (žr. C.1 bandymo metodą), geriau atlikto su šiam bandymui pasirinkta rūšimi, rezultatus. Tai reikėtų, kad yra žinomas bandomosios medžiagos tirpumas vandenyje ir garų slėgis ir kad yra patikimas analizės metodas bandomajai medžiagai bandomuosiuose tirpaluose kiekybiškai nustatyti žinomu tikslumu ir aptikimo riba, kurie nurodyti ataskaitoje.

<sup>(1)</sup> 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.

Naudingą informaciją sudaro struktūrinė formulė, medžiagos grynumas, stabilumas vandenyje ir veikiant šviesai,  $pK_a$ ,  $P_{ow}$  ir lengvo biologinio skaidumo bandymo rezultatai (žr. C.4 metodą).

#### 1.5. BANDYMO TINKAMUMAS

Bandymas yra tinkamas, jei įvykdytos šios sąlygos:

- baigiant bandymą kontrolinio (-ių) bandinio (-ių) žuvų gaištamumas turi būti ne didesnis kaip 10 %,
- kontrolinio (-ių) bandinio (-ių) vidutinė žuvų masė turi būti pakankamai padidėjusi, kad būtų galima aptikti mažiausią augimo greičio kitimą, kuris laikomas reikšmingu. Tarplaboratorinio lyginimo bandymas (2) parodė, kad kontrolinių bandinių vaivorykštinio upėtakio vidutinė masė per 28 paras turi padidėti bent pusę jo pradinės vidutinės masės (t. y. 50 %); pvz., pradinė masė: 1 g/žuviai (= 100 %), galutinė masė po 28 parų:  $\geq 1,5$  g/žuviai ( $\geq 150$  %),
- ištirpusio deguonies koncentracija per visą bandymą turi sudaryti bent 60 % oro prisotrinimo vertės (ASV),
- kiekvienu bandymo momentu bandymo kamerų vandens temperatūra turi nesiskirti daugiau kaip  $\pm 1$  °C ir būti palaikoma 2 °C intervale bandomosioms rūšims nurodytame intervale (1 priedėlis).

#### 1.6. BANDYMO METODO APRAŠYMAS

##### 1.6.1. Aparatūra

Įprasta laboratorinė įranga ir ši specialii įranga:

- deguonies ir pH matuokliai,
- įranga vandens kietumui ir šarmingumui nustatyti,
- atitinkama aparatūra temperatūrai kontroliuoti, geriau nuolatinės kontrolės aparatūra,
- rezervuarai, pagaminti iš chemiškai inertiškos medžiagos, kurių talpa atitinka rekomenduotą įkrovą bei žuvų tankį (žr. 1.8.5 skirsnį ir 1 priedėlį),
- reikiamo tikslumo svarstyklės (t. y.  $\pm 0,5$  % 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 atliekant konkretų bandymą pH reikšmė neturi kisti daugiau kaip  $\pm 0,5$  pH vieneto. Rekomenduojamas didesnis kaip 140 mg/l (skaičiuojant  $\text{CaCO}_3$ ) 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. Sunkųjų metalų jonų (pvz., Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), pagrindinių anijonų ir katijonų (pvz., Ca, Mg, Na, K, Cl,  $\text{SO}_4$ ), pesticidų (pvz., bendro fosforo organinių pesticidų ir bendro chloro organinių pesticidų kiekio), bendrosios organinės anglies ir suspenduotų kietųjų dalelių analizė turi būti atliekama, pavyzdžiui, kas tris mėnesius, jei žinoma, kad skiedimo vandens kokybė yra gana pastovi. Jei buvo įrodyta, kad vandens kokybė yra pastovi bent metus, analizė gali būti atliekama ne taip dažnai, o intervalai padidinti (pvz., kas šešis mėnesius). Kai kurios skiedimui tinkamo vandens charakteristikos yra pateiktos 2 priedėlyje.

##### 1.6.3. Bandomieji tirpalai

Pasirinktos koncentracijos bandomieji tirpalai ruošiami skiedžiant pradinį tirpalą.

Pradinį tirpalą geriau ruošti bandomąją medžiagą maišant ar plakant skiedimo vandenyje mechaninėmis priemonėmis (pvz., maišykle ar ultragarsu). Pakankamai koncentruotam pradiniam tirpalui ruošti galima naudoti prisotrinimo kolonėles (tirpumo kolonėles).

Kartais norint gauti tinkamos koncentracijos pradinį tirpalą gali tekti naudoti tirpiklius ar dispergatorius (tirpinimo medžiagas). Tinkami tirpikliai yra acetonas, etanolis, metanolis, dimetilsulfoksidas, dimetilformamidas ir trietilenglikolis. Tinkami dispergatoriai yra *Cremophor* RH40, *Tween* 80, 0,01 % metilceliuliozė ir HCO-40. Reikėtų atsargiai naudoti lengvai biologiškai skaidomas medžiagas (pvz., acetoną) ir (ar) labai lakius junginius, nes, atliekant dinامينius bandymus, jie gali kelti problemų dėl bakterijų kaupimosi. Naudojama tirpinimo medžiaga neturi daryti reikšmingo poveikio žuvų augimui ir neigiamo poveikio mailiui, kaip kad nustatoma atliekant kontrolinį bandymą vien tik su tirpikliu.

Įvairios bandomosios koncentracijos tirpalams į bandymo kameras tiekti dinaminį bandymų metu reikalinga sistema, kuri nepertraukiamai dozuotų ir skiestų bandomosios medžiagos pradinį tirpalą (pvz., dozavimo siurblys, proporcingasis skiestuvas, prisotinimo sistema). Pradinių tirpalų ir skiedimo vandens srautai turi būti kartais, geriau kasdien, tikrinami ir per visą bandymą neturėtų kisti daugiau kaip 10 %. Tarplaboratorinio palyginimo bandymas (2) parodė, kad, atliekant bandymą su vaivorykštiniu upėtakiu, yra priimtinas 6 litrų/g žuvies/parai vandens keitimo dažnis (žr. 1.8.2.2 skirsnį).

Pusiau statiniams (atnaujinimo) bandymams terpės atnaujinimo dažnis priklausys nuo bandomosios medžiagos stabilumo, tačiau vandenį atnaujinti rekomenduojama kasdien. Jei pradiniai stabilumo bandymai (žr. 1.4 skirsnį) rodo, kad bandomosios medžiagos koncentracija laikotarpiu tarp atnaujinimų yra nestabili (t. y. yra už 80–120 % vardinės koncentracijos ribų ar mažesnė kaip 80 % išmatuotos pradinės koncentracijos), reikėtų numatyti dinaminį bandymą.

#### 1.6.4. Rūšių parinkimas

Šiam bandymui rekomenduojama rūšis yra vaivorykštinis upėtakis (*Oncorhynchus mykiss*), nes didžiausia tarplaboratorinio palyginimo bandymų patirtis buvo sukaupta naudojant šią rūšį (1) (2). Galima naudoti ir kitas dokumentais tinkamai patvirtintas rūšis, bet tinkamoms bandymo sąlygoms gauti bandymo metodiką gali tekti pritaikyti. Pvz., įgyta patirtis su zebrine danija (*Danio rerio*) (3) (4) ir japonine medaka (*medaka*, *Oryzias latipes*) (5) (6) (7). Tokiu atveju ataskaitoje reikia pateikti rūšies pasirinkimo priežastį ir bandymo metodą.

#### 1.6.5. Žuvų laikymas

Pasirenkamos vienos populiacijos ir geriau to paties neršto bandomosios žuvys, kurios prieš bandymą bent dvi savaites buvo laikomos tokios kokybės vandenyje ir tokiomis apšvietimo sąlygomis, kurios panašios į bandymo sąlygas. Jų dienos maisto davinytys 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.

#### 1.7. BANDYMO SCHEMA

„Bandymo schema“ – bandomosios koncentracijos verčių ir tarpo tarp jų pasirinkimas, rezervuarų skaičiaus kiekvienai koncentracijai ir žuvų skaičiaus viename rezervuare parinkimas. Geriausia būtų, kad bandymo schema būtų pasirinkta atsižvelgiant į:

- tyrimo tikslą,
- taikomą statistinės analizės metodą,
- bandymo išteklių buvimą ir kainą.

Jei įmanoma, išdėstant tikslą reikėtų nurodyti statistinę galią duoto dydžio (pvz., augimo greičio) skirtumui aptikti, arba kitaip, koks turi būti  $EC_x$  (pvz., kai  $x = 10, 20$  ar  $30$  ir geriau ne mažesnis kaip  $10$ ) įvertinimo preciziškumas. Be šito negalima tiksliai apibrėžti tyrimo apimties.

Svarbu pripažinti, kad vienam statistinės analizės metodui taikytas optimalus (geriausiai panaudoja išteklius) planas nebūtinai yra optimalus kitam metodui. Taigi rekomenduotas planas LOEC/NOEC įvertinti nebus toks pat kaip regresinei analizei rekomenduotas planas.

Dėl Stephan ir Rogers (8) svarstyty priežasčių regresinė analizė dažniausiai tinka geriau nei dispersinė analizė. Tačiau nerandant tinkamo regresijos modelio ( $r^2 < 0,9$ ), reikia taikyti NOEC/LOEC įvertinimą.

#### 1.7.1. Regresinės analizės planas

Svarbūs regresijos metodu analizuojamos bandymo schemos nagrinėtini klausimai yra šie:

- Bandymui naudotos koncentracijos būtinai turi aprėpti poveikio koncentraciją (pvz.,  $EC_{10, 20, 30}$ ) ir dominančio medžiagos poveikio koncentracijos verčių intervalą. Poveikio koncentracijos įverčių preciziškumas bus geriausias, kai poveikio koncentracijos bus per bandomųjų koncentracijos verčių intervalo vidurį. Tinkamoms bandomosioms koncentracijoms parinkti gali būti naudingas išankstinis intervalo nustatymo bandymas.
- Norint turėti tinkamą statistinį modelį, bandymui turi būti naudojamas vienas kontrolinis rezervuaras ir penki papildomi rezervuarai, skirti skirtingoms koncentracijos vertėms. Jei naudojama tirpinimo medžiaga, be bandomosios serijos, turi būti dar vienas kontrolinis bandinys su didžiausios bandomosios koncentracijos tirpinimo medžiaga (žr. 1.8.3 ir 1.8.4 skirsnius).
- Galima naudoti tinkamą geometrinės progresijos ar logaritminę eilutę (9) (žr. 3 priedėlį). Geriau naudoti logaritminę bandomųjų koncentracijų eilutę.
- Jei yra daugiau kaip šeši rezervuarai, papildomi rezervuarai turi būti panaudoti lygiagrečiams bandymams arba paskirstyti visam koncentracijos verčių intervalui tarpams tarp jų sumažinti. Abi šios priemonės vienodai tinka.

#### 1.7.2. NOEC/LOEC įvertinimo planas taikant dispersinę analizę (ANOVA)

Kiekvienai koncentracijos vertei geriau būtų turėti dar vieną rezervuarą ir statistinė analizė turėtų būti atliekama rezervuaro lygiu (10). Jei nėra rezervuarų lygiagrečiam bandymui, neišmanoma atsižvelgti į kintamumą tarp rezervuarų be to kintamumo, kuris atsiranda dėl atskirų žuvų. Tačiau patirtis rodo (11), kad tiriamu atveju kintamumas tarp rezervuarų buvo labai mažas lyginant su kintamumu viename rezervuare (t. y. tarp žuvų). Taigi santykinai priimtina alternatyva yra statistinę analizę daryti kiekvienos žuvies lygiu.

Paprastai naudojamos bent penkios koncentracijos vertės, sudarančios eilutę pagal geometrinę progresiją, kurios koeficientas geriausiai turėtų būti ne didesnis kaip 3,2.

Kai bandymai atliekami turint rezervuarus 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 atliekama rezervuarų lygiu, o ne kiekvienos žuvies lygiu (tam reikėtų kiekvieną žuvį paženklinoti 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 atliekami tik lygiagretūs kontroliniai bandymai, esama pavojaus, kad paklaidos kintamumas bus pakitęs, nes paklaida gali didėti didėjant tiriamo augimo greičio vidutinei vertei. Kadangi augimo greitis koncentracijai didėjant greičiausiai mažės, atsiranda tendencija per daug sureikšminti kintamumą.

## 1.8. BANDYMO PROCEDŪRA

### 1.8.1. Bandomųjų žuvų atranka ir svėrimas

Svarbu, kad žuvų masės skirtumas bandymo pradžioje būtų kuo mažesnis. Bandymams rekomenduotų skirtingų rūšių žuvų masės tinkami intervalai yra pateikti 1 priedėlyje. Būtų geriausia, kad bandymo pradžioje visos partijos žuvų masės kitimo intervalas būtų lygus žuvų masės aritmetiniam vidurkiui  $\pm 10\%$  ir jokių būdu nebūtų didesnis kaip  $25\%$ . Vidutinei masei nustatyti rekomenduojama prieš bandymą pasverti žuvų ėminio dalį.

Žuvis turi būti nustojamos maitinti prieš 24 h iki bandymo pradžios. Toliau jos turi būti atsitiktinai atrenkamos. Vartojant bendrąjį anestetiką (pvz., vandeninį 100 mg/l (3-aminobenzenkarboninės rūgšties etilesterio metansulfonato (MS 222) tirpalą, neutralizuotą sumaišant dvi dalis natrio hidrokarbonato ir vieną dalį MS 222), žuvis turi būti atskirai pasveriamos gyvų žuvų (sausai nušluostytų filtro popieriumi) masei nustatyti 1 priedėlyje nurodytu tikslumu. Tos žuvis, kurių masė atitinka numatytą intervalą, paliekamos ir vėliau paskirstomos tarp bandymo indų. Turi būti registruojama bendra kiekvieno bandymo indo gyvų žuvų masė. Anestetiko vartojimas, taip pat apdorojimas (įskaitant šluostymą ir svėrimą) žuvų mailiui gali sukelti įtampą ir jį galima sužeisti, ypač jei tai mažų žuvų rūšys. Taigi apdoroti mailių reikia ypač atsargiai ir vengti bandomųjų gyvūnų įtamos ir sužeidimų.

Žuvis vėl sveriamos 28 bandymo parą (žr. 1.8.6 skirsnį). Tačiau, jei manoma, kad būtina perskaičiuoti maisto davinį, žuvis 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  $\geq 28$  paros.

#### 1.8.2.2. Įkrova ir žuvų tankis

Svarbu, kad įkrova ir žuvų tankis atitiktų naudojamas žuvų rūšis (žr. 1 priedėlį). Jei žuvų tankis per didelis, dėl perpildymo sukeltos įtamos mažėja augimo greitis ir žuvis gali susirgti. Jei žuvų tankis per mažas, gali atsirasti teritorinis elgesys, kuris irgi gali veikti augimą. Bet kuriuo atveju įkrova turi būti gana maža, kad be aeravimo būtų palaikoma bent  $60\%$  ASV ištirpusio deguonies koncentracija. Tarplaboratorinis bandymas (2) parodė, kad vaivorykštiniams upėtakiui priimtina įkrova, kai 40 l tūrio vandenyje yra 16 upėtakių po 3–5 g masės. Rekomenduojamas vandens keitimo atliekant bandymą dažnis yra 6 litrai/g žuvis/parai.

#### 1.8.2.3. Maitinimas

Žuvis turi būti šeriamos atitinkamu maistu (1 priedėlis) ir pakankamai dažnai, kad būtų garantuotas priimtinas augimo greitis. Reikėtų stengtis išvengti mikrobu dauginimosi ir vandens drumstumo. Vaivorykštiniams upėtakiui  $4\%$  kūno masės davinys per parą turėtų atitikti šias sąlygas (2) (15) (16) (17). Paros davinys turi būti padalintas į dvi lygias dalis ir sušeriamas žuvis per du kartus darant bent penkių valandų pertrauką. Davinys grindžiamas kiekvieno bandymo indo bendra pradine žuvų mase. Jei žuvis vėl sveriamos 14 parą, davinys perskaičiuojamas. Prieš sveriant žuvis turi būti nemaitintos 24 h.

Nesuėstas maistas ir išmatos iš bandymo indų turi būti šalinami kasdien rūpestingai išsiurbiant kiekvieno rezervuaro dugną.

#### 1.8.2.4. Šviesa ir temperatūra

Apšvietimo laikotarpis ir vandens temperatūra turi atitikti žuvų rūšį (1 priedėlis).

### 1.8.3. Bandomosios medžiagos koncentracijos

Paprastai reikia naudoti penkias bandomosios medžiagos koncentracijas, neatsižvelgiant į bandymo schemą (žr. 1.7.2 skirsnį). Ankstesnės žinios apie bandomosios medžiagos toksiškumą (pvz., ūmaus toksiškumo bandymo ir (ar) koncentracijų intervalo nustatymo tyrimo duomenys) turėtų padėti renkant tinkamas bandomąsias koncentracijas. Sprendimą naudoti mažiau kaip penkias koncentracijas reikia pagrįsti. Didžiausia išbandyta koncentracija neturėtų būti didesnė kaip medžiagos tirpumo vandenyje ribinė koncentracija.

Jei pradinio tirpalo ruošimui lengvinti naudojama tirpinimo medžiaga, jos galutinė koncentracija turi būti ne didesnė kaip 0,1 ml/l, ir geriau būtų, jei ji visuose bandymo induose būtų vienoda (žr. 1.6.3 skirsnį). Tačiau reikėtų kiek įmanoma stengtis vengti šias medžiagas naudoti.

### 1.8.4. Kontroliniai bandiniai

Skiedimo vandens kontrolinių bandinių skaičius priklauso nuo bandymo schemos (žr. 1.7–1.7.2 skirsnius). Jei naudojama tirpinimo medžiaga, į bandymo schemą turi būti įtrauktas toks tirpinimo medžiagos kontrolinių bandinių skaičius, kiek yra skiedimo vandens kontrolinių bandinių.

### 1.8.5. Kiekybinių analizių ir matavimų dažnis

Atliekant bandymą bandomosios medžiagos koncentracijų vertės nustatomos reguliariais tarpais (žr. toliau).

Atliekant dinامينius bandymus, skiediklio ir toksinės medžiagos pradinio tirpalo srantai 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  $\pm 20\%$  (t. y. 80–120 % intervalu; žr. 1.6.2 ir 1.6.3 skirsnius), rekomenduojama bent didžiausią ir mažiausią bandomąją koncentraciją nustatyti bandymo pradžioje, o vėliau kas savaitę. Jei atliekant bandymus nesitikima, kad bandomosios medžiagos koncentracija gali likti  $\pm 20\%$  vardinės koncentracijos vertės (pagal bandomosios medžiagos stabilumo duomenis), būtina nustatyti visas bandomąsias koncentracijas, bet pagal tą patį grafiką.

Jei tikimasi, kad atliekant pusiau statinius (atnaujinimo) bandymus, bandomosios medžiagos koncentracija liks  $\pm 20\%$  vardinės koncentracijos vertės, rekomenduojama nustatyti bent didžiausią ir mažiausią bandomąją koncentraciją iš karto po tirpalo paruošimo ir prieš pat jo atnaujinimą tyrimo pradžioje ir kas savaitę vėliau. Jei tai bandymai, kuriuos atliekant nemanoma, kad koncentracija liks  $\pm 20\%$  vardinės koncentracijos vertės, turi būti nustatomos visos koncentracijos vertės laikantis to paties kaip ir stabilėnėms medžiagoms analizės režimo.

Rekomenduojama rezultatus pagrįsti išmatuotomis koncentracijos vertėmis. Tačiau jei yra įrodymų, kad bandomosios medžiagos koncentracija visą bandymo laiką buvo pakankamai palaikoma  $\pm 20\%$  vardinės koncentracijos vertės ar išmatuotos pradinės koncentracijos vertės, rezultatai gali būti grindžiami vardine ar išmatuota vertėmis.

Bandinius gali tekti filtruoti (pvz., pro 0,45  $\mu\text{m}$  akytumo filtra) ar centrifuguoti. Rekomenduojama metodika būtų centrifugavimas. Tačiau, jei filtras bandomosios medžiagos neadsorbuoja, priimtinas būtų ir filtravimas.

Atliekant bandymą visuose bandymo induose turi būti matuojama ištirpusio deguonies koncentracija, pH ir temperatūra. Turi būti matuojamas kontrolinių bandinių ir indo su didžiausios koncentracijos bandiniu bendras kietumas, šarmingumas ir sūrumas (jei tinka). Matuojama bent ištirpusio deguonies koncentracija ir sūrumas (jei tinka) tris kartus (bandymo pradžioje, viduryje ir pabaigoje). Atliekant pusiau statinius bandymus, ištirpusio deguonies koncentraciją rekomenduojama matuoti dažniau, geriau prieš kiekvieną vandens atnaujinimą ir po jo ar bent kartą per savaitę. Atliekant statinius bandymus su atnaujinimu pH vertė turi būti matuojama prieš kiekvieną vandens atnaujinimą ir po jo, o atliekant dinامينius bandymus – bent kartą per savaitę. Vandens kietumas ir šarmingumas kiekvienam bandymui matuojami vieną kartą. Temperatūrą bent viename bandymo inde geriau kontroliuoti nuolatos.

### 1.8.6. Stebėjimai

Masė: baigiant bandymą visos gyvos žuvis turi būti pasvertos gyvų žuvų (sausai nušluostytų filtro popieriumi) masei nustatyti grupėmis pagal bandymo indus ar atskirai kiekviena žuvis. Labiau tinka svėrimas bandymo induose, nes, sveriant kiekvieną žuvį, jas reikėtų atskirai ženklinti. Nustatant atskirų žuvų masę kiekvienos žuvies savitajam augimo greičiui nustatyti, pasirinktoji ženklavimo metodika gyvūnams neturi kelti įtampas (gali tiktai žuvų šaltojo ženklavimo alternatyvos, pvz., plonas spalvotas valas).

Žuvys visą bandymo laiką turi būti tiriamos kasdien ir bet kokios išorės anomalijos (pvz., kraujavimas, spalvos pakeitimas) bei neįprastas elgesys turi būti pažymėti. Turi būti registruojami visi gaištamumo atvejai, o negyvos žuvys kuo greičiau pašalinamos. Jei įkrova ir žuvų tankis yra pakankami, negyvos žuvys kitomis nekeičiamos, kad būtų išvengta poveikio augimui dėl vienam rezervuarui tenkančio žuvų skaičiaus kitimo. Tačiau maitinimo normą reikia koreguoti.

## 2. DUOMENYS IR ATASKAITA

### 2.1. REZULTATŲ APDOROJIMAS

Rekomenduojama, kad, rengiant bandymo schemą ir ją analizuojant, dalyvautų statistikas, nes šis bandymo metodas leidžia smarkiai keisti eksperimento planą, pvz., bandymo kamerų skaičių, bandomųjų koncentracijų skaičių, žuvų skaičių ir t. t. Atsižvelgiant į bandymo schemos variantų įvairovę, jokių specialių nurodymų dėl statistinės metodikos čia nepateikiama.

Augimo greitis neturėtų būti apskaičiuojamas bandymo indams, jei gaištamumas juose didesnis kaip 10 %. Tačiau gaištamumas turi būti nurodytas visoms bandomosioms koncentracijoms.

Nesvarbu, koks metodas taikomas duomenims analizuoti, svarbiausia sąvoka yra savitasis augimo greitis  $r$  tarp laiko  $t_1$  ir  $t_2$ . Jis gali būti nustatytas keliais būdais pagal tai, ar žuvys yra ženklinamos atskirai ar ne, arba pagal tai, ar reikia nustatyti rezervuarui vidutinį greitį.

$$r_1 = \left( \left( \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{t_2 - t_1} \right) \times 100 \right)$$

$$r_2 = \left( \left( \frac{((\log_e W_2) - (\log_e W_1))}{(t_2 - t_1)} \right) \times 100 \right)$$

$$r_3 = \left( \left( \frac{((\log_e W_2) - (\log_e W_1))}{(t_2 - t_1)} \right) \times 100 \right)$$

čia:

$r_1$  = atskiros žuvies savitasis augimo greitis

$r_2$  = vidutinis savitasis augimo greitis rezervuarui

$r_3$  = „pseudo“ savitasis augimo greitis

$w_1, w_2$  = konkrečios žuvies masė, atitinkamai, laiku  $t_1$  ir  $t_2$

$\log_e w_1$  = atskiros žuvies masės tyrimo pradžioje logaritmas

$\log_e w_2$  = atskiros žuvies masės tyrimo pabaigoje logaritmas

$\log_e w_1$  = tyrimo pradžioje nustatytos rezervuaro žuvų masės  $w_1$  logaritmų verčių vidurkis

$\log_e w_2$  = tyrimo pabaigoje nustatytos rezervuaro žuvų masės  $w_2$  logaritmų verčių vidurkis

$t_1, t_2$  = tyrimo laikotarpio pradžios ir pabaigos laikas (paros).

$r_1, r_2, r_3$  gali būti apskaičiuoti 0–28 parų laikotarpiui ir, jei tinka (t. y. kai buvo matuojama 14-tą parą), 0–14 ir 14–28 parų laikotarpiams.

#### 2.1.1. Rezultatų analizė taikant regresiją (koncentracijos ir atsako santykio modeliavimas)

Šis analizės metodas nustato atitinkamą savitojo augimo greičio ir koncentracijos matematiškai išreiškiamą santykį, taigi leidžia įvertinti  $EC_{50}$ , t. y. kiekvieną reikiamą EC vertę. Taikant šį metodą atskiros žuvies  $r$  vertės ( $r_1$ ) apskaičiuoti nebūtina, vietoj to analizė gali būti pagrįsta vidutine  $r$  verte rezervuarui ( $r_2$ ). Geriau taikyti pastarąjį metodą. Jis taip pat labiau tinka naudojant mažiausių žuvų rūšis.

Norint iširti koncentracijos ir atsako santykį, vidutiniai savitieji augimo greičiai rezervuarui ( $r_2$ ) turi būti grafiškai pažymimi kaip koncentracijos funkcija.

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, paprasčiau 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 pasiskliovimo intervalą). Pritaikyto modelio grafikas turėtų būti parodytas lyginant su duomenimis, kad būtų galima įvertinti pritaikyto modelio tinkamumą (8) (18) (19) (20).

### 2.1.2. Rezultatų analizė LOEC įvertinti

Jei atliekant bandymą rezervuarai lygiagrečiam bandymui yra visoms koncentracijos vertėms, LOEC įvertinimas gali būti grindžiamas vidutinio savitojo augimo greičio rezervuarui dispersine analize (ANOVA) (žr. 2.1 skirsnį), vėliau taikant tinkamą metodą (pvz., Dunnett ar Williams bandymą (12) (13) (14) (21), kuriuo kiekvienos koncentracijos vidutinė  $r$  vertė lyginama su kontrolinių bandinių vidutine  $r$  verte norint nustatyti mažiausią koncentraciją, kuriai šis skirtumas yra reikšmingas esant 0,05 tikimybės lygmeniui. Jei parametriniais metodams reikiamos hipotezės (nenormalus pasiskirstymas (pvz., *Shapiro–Wilk* bandymas) ar heterogeninė sklaida (*Bartlett* bandymas)) nepasitvirtina, reikėtų numatyti duomenų pertvarkymą sklaidoms homogenizuoti prieš atliekant dispersinę analizę ar atlikti svorinę dispersinę analizę.

Jei atliekant bandymą rezervuarai lygiagrečiam bandymui yra ne visoms koncentracijos vertėms, rezervuarais pagrįsta dispersinė analizė bus neįmanoma. Šiuo atveju priimtinas kompromisas yra dispersinei analizei panaudoti kiekvienos žuvies „pseudo“ savitąjį augimo greitį  $r_3$ .

Toliau vidutinė  $r_3$  vertė kiekvienai koncentracijai gali būti lyginama su vidutine  $r_3$  verte kontroliniams bandiniams. Tuomet LOEC gali būti nustatytas taip, kaip buvo daryta pirmiau. Būtina pripažinti, kad šis metodas neatsižvelgia į kintamumą tarp rezervuarų, išskyrus kintamumą tarp atskirų žuvų, ir šiuo požiūriu nesuteikia jokios apsaugos. Tačiau patirtis rodo (8), kad kintamumas tarp rezervuarų buvo labai mažas lyginant su kintamumu rezervuare (t. y. tarp žuvų). Jei analizė neapima kiekvienos žuvies duomenų, būtina numatyti išskirčių identifikavimo metodą ir pagrįsti jo taikymą.

## 2.2. REZULTATŲ AIŠKINIMAS

Rezultatai turi būti aiškinami atsargiai, jei išmatuotos bandomųjų tirpalų toksinių medžiagų koncentracijos vertės yra arti analizės metodo aptikimo ribos arba jei atliekant pusiau statinius bandymus bandomosios medžiagos tirpalo prieš atnaujinimą koncentracija yra mažesnė kaip šviežiai paruošto tirpalo koncentracija.

## 2.3. BANDYMO ATASKAITA

Bandymo ataskaitoje turi būti pateikta ši informacija:

### 2.3.1. Bandomoji medžiaga:

- fizikinė būsena ir atitinkamos fizikinės ir cheminės savybės,
- cheminio identifikavimo duomenys, įskaitant grynumą, ir, jei tinka, analizės metodas bandomajai medžiagai kiekybiškai nustatyti.

### 2.3.2. Bandomieji gyvūnai:

- mokslinis pavadinimas (gali būti),
- veislė, dydis, tiekėjas, bet koks išankstinis apdorojimas ir t. t.

### 2.3.3. Bandymo sąlygos:

- taikytas bandymo metodas (pvz., pusiau statinis/su atnaujinimu, dinaminis, įkrova, žuvų tankis ir t. t.),
- bandymo schema (pvz., bandymo indų skaičius, bandomosios koncentracijos ir lygiagrečių bandinių skaičius, žuvų skaičius viename inde),

- pradinių tirpalų ruošimo metodas ir jų atnaujinimo dažnis (jei naudojama tirpinimo medžiaga, turi būti nurodyta jos koncentracija),
- vardinės bandomosios koncentracijos, bandymo indų nustatytų koncentracijų vidutinės vertės ir jų standartiniai nuokrypiai bei nustatymo metodas ir įrodymai, kad buvo daromi tikrųjų bandomosios medžiagos tirpalų matavimai,
- skiedimo vandens charakteristikos: pH, kietumas, šarmingumas, temperatūra, ištirpusio deguonies koncentracija, liekamojo chloro lygiai (jei matuoti), bendroji organinė anglis, suspenduotos kietosios dalelės, bandymo terpės sūrumas (jei matuota) ir visi kiti daryti matavimai,
- bandymo indų vandens kokybė: pH, kietumas, temperatūra ir ištirpusio deguonies koncentracija,
- išsami informacija apie šėrimą (pvz., davinio rūšis (-ys), šaltinis, duodamas kiekis ir šėrimo dažnumas).

#### 2.3.4. **Rezultatai:**

- duomenys, kad kontroliniai bandiniai atitinka išgyvenimo patikimumo kriterijų, ir duomenys apie gaištamumą visose bandomosiose koncentracijose,
- taikytos statistinės analizės metodikos, statistika, pagrįsta lygiagrečiais bandymais ar žuvimis, duomenų apdorojimas ir naudotų metodikų pagrindimas,
- lentelėse pateikti 0, 14 (jei matuota) ir 28 paros atskirų žuvų ir vidutinės žuvų masės duomenys rezervuarui vidutinio augimo greičio ar „pseudo“ savitojo augimo greičio (jei tinka) vertės 0–28 parų laikotarpiu ar galbūt 0–14 ir 14–28 parų laikotarpiu,
- statistinės analizės (t. y. regresinės analizės ar dispersinės analizės) rezultatai, geriau lentelių ir grafikų pavidalu, LOEC ( $p = 0,05$ ) bei NOEC ar EC<sub>x</sub> vertės, nurodant, kai įmanoma, atitinkamas standartines paklaidas,
- 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.
- 14) Williams D.A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27, p. 103–117.
- 15) Johnston, W.L., Atkinson, J.L., Glanville N.T. (1994). A technique using sequential feedings of different coloured food to determine food intake by individual rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: effect of feeding level. Aquaculture 120, 123–133.
- 16) Quinton, J. C. and Blake, R.W. (1990). The effect of feed cycling and ration level on the compensatory growth response in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Journal of Fish Biology, 37, 33–41.
- 17) Post, G. (1987). Nutrition and Nutritional Diseases of Fish. Chapter IX in Testbook of Fish Health. T.F.H. Publications, Inc. Neptune City, New Jersey, USA. 288 P.
- 18) Bruce, R.D. and Versteeg D.J. (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Environ. Toxicol. Chem. 11, 1485–1494.
- 19) DeGraeve, G.M., Cooney, J.M., Pollock, T.L., Reichenbach, J.H., Dean, Marcus, M.D. and McIntyre, D.O. (1989). Precision of EPA seven-day fathead minnow larval survival and growth test; intra and interlaboratory study report EA-6189 (American Petroleum Institute Publication, n. 4468). Electric Power Research Institute, Palo alto, CA.
- 20) Norbert-King T.J. (1988). An interpolation estimate for chronic toxicity: the IC<sub>p</sub> 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)	Būtinasis matavimo tikslumas	Įkrova (g/l)	Gyvūnų tankis (litrai)	Maistas	Bandyimo trukmė (paros)
<b>Rekomenduojamos rūšys:</b> <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
<b>Kitos dokumentais tinkamai patvirtintos rūšys:</b> <i>Danio rerio</i> Zebrinė danija	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> Japoninė 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 priedėlis

**KAI KURIOS TINKAMO SKIEDIMO VANDENS CHEMINĖS CHARAKTERISTIKOS**

Medžiaga	Koncentracija
Kietosios dalelės	< 20 mg/l
Bendroji organinė anglis	< 2 mg/l
Nejonizuotas amoniakas	< 1 µg/l
Liekamasis chloras	< 10 µg/l
Bendras fosforo organinių pesticidų kiekis	< 50 ng/l
Bendras chloro organinių pesticidų ir polichlorintų bifenių kiekis	< 50 ng/l
Bendras organinis chloras	< 25 ng/l



## 3 priedėlis

## Toksiškumo bandymui tinkamų koncentracijų logaritminė eilutė (9)

Stulpelis (koncentracijų tarp 100 ir 10 ar tarp 10 ir 1 skaičius) (*)						
1	2	3	4	5	6	7
100	100	100	100	100	100	100
32	46	56	63	68	72	75
10	22	32	40	46	52	56
3,2	10	18	25	32	37	42
1,0	4,6	10	16	22	27	32
	2,2	5,6	10	15	19	24
	1,0	3,2	6,3	10	14	18
		1,8	4,0	6,8	10	13
		1,0	2,5	4,6	7,2	10
			1,6	3,2	5,2	7,5
			1,0	2,2	3,7	5,6
				1,5	2,7	4,2
				1,0	1,9	3,2
					1,4	2,4
					1,0	1,8
						1,3
						1,0

(\*) Stulpelyje galima pasirinkti penkių (ar daugiau) viena po kitos einančių koncentracijų eilutę. Stulpelio (x) koncentracijų vidurio taškai randami stulpelyje  $(2x + 1)$ . Sąraše nurodytos vertės gali būti išreikštos procentine tūrio dalimi ar masės koncentracija (mg/l ar µg/l). Vertės gali būti padaugintos ar padalytos iš 10, pakelto bet kuriuo tinkamu laipsniu. 1 stulpelį galima būtų naudoti, jei toksiškumo lygio neapibrėžtis yra didelė.

## C.15. TRUMPALAIKIO TOKSIŠKUMO BANDYMAS ŽUVIMS EMBRIONO IR TRYNIO MAIŠELIO STADIJOSE

### 1. METODAS

Šis trumpalaikio toksiškumo bandymo metodas yra OECD TG 212 (1998) kopija.

#### 1.1. ĮVADAS

Šis trumpalaikio toksiškumo žuvų embrionui ir mailiui su trynio maišeliu bandymas yra trumpalaikis bandymas, kai ką tik apvaisinti žuvų ikrų yra veikiami nuo jų apvaisinimo iki mailiaus su trynio maišeliu stadijos pabaigos. Toksiškumas embrionui ir mailiui su trynio maišeliu bandomas be maitinimo, bandymas turi būti baigtas, kai mailius dar maitinamas iš trynio maišelio.

Bandymo tikslas – nustatyti cheminių medžiagų letalius ir mažesniu laipsniu subletalius poveikius specifinėms vystymosi stadijoms ir bandytai rūšiai. Šis bandymas turėtų suteikti vertingos informacijos, nes jis galėtų: a) būti jungtimi tarp letalumo ir subletalumo bandymų; b) būti taikomas kaip atrankos bandymas numatant visą pradinio gyvenimo stadijų bandymą ar lėtinio toksiškumo bandymus; ir c) būti taikomas bandyti rūšis, kurių auginimo metodai nėra pakankamai pažangūs, kad aprėptų perėjimo iš endogeninio į egzogeninį maitinimo laikotarpį.

Žinotina, kad paprastai tik visas žuvies gyvenimo ciklo stadijas apimantys bandymai gali duoti tikslų lėtinio toksiškumo žuvims įvertį ir kad bent kiek sutrumpinus veikimą neįtraukiant kurios nors gyvenimo stadijos, gali sumažėti jautrumas, taigi gali būti nepakankamai įvertintas lėtinis toksiškumas. Todėl manoma, kad embriono ir mailiaus su trynio maišeliu bandymas turėtų būti ne toks jautrus kaip visas pradinio gyvenimo stadijų bandymas, ypač turint galvoje labai lipofiliškas chemines medžiagas ( $\log P_{ow} > 4$ ) ir specifinio toksinio veikimo chemines medžiagas. Tačiau mažesnių jautrumo skirtumų tarp dviejų bandymų reikėtų tikėtis nespėcinio narkotinio poveikio tipo cheminėms medžiagoms (1).

Dar prieš šio bandymo paskelbimą daugiausia patirties atliekant embriono ir mailiaus su trynio maišeliu bandymą buvo sukaupta su gėlavandene žuvimi *Danio rerio* Hamilton-Buchanan (*Teleostei*, *Cyprinidae* – įprastas pavadinimas zebrynė danija). Taigi smulkesni nurodymai, kaip atlikti šios žuvų rūšies bandymą, pateikti 1 priedėlyje. Tačiau tai netrukdo naudoti kitas rūšis, kurias bandant yra sukaupta patirties (1 lentelė).

#### 1.2. APIBRĖŽTYS

**Mažiausia pastebimą poveikį sukianti koncentracija (LOEC):** mažiausia bandomosios medžiagos koncentracija, kuriai esant medžiagos poveikis yra statistškai reikšmingas lyginant su kontroliniais bandiniais (kai  $p < 0,05$ ). Tačiau visų didesnių kaip LOEC bandomųjų koncentracijų kenksmingas poveikis turi būti lygus ar didesnis kaip LOEC poveikis.

**Nepastebėto poveikio koncentracija (NOEC):** bent kiek už LOEC mažesnė bandomoji koncentracija.

#### 1.3. BANDYMO METODO PRINCIPAS

Embriono ir mailiaus su trynio maišeliu augimo stadijų žuvis veikiama vandeniniais kelių koncentracijos verčių bandomosios medžiagos tirpalais. Bandymo protokolas leidžia pasirinkti pusiau statinį ar dinaminį bandymą. Pasirinkimas priklauso nuo bandomosios medžiagos prigimties. Bandymas pradamas 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 atlikto su šiam bandymui pasirinkta rūšimi, rezultatus. Rezultatai gali būti naudingi ankstyvųjų gyvenimo tarpsnių bandymui pasirenkant atitinkamą bandomųjų koncentracijų intervalą. Turi būti žinomas medžiagos tirpumas vandenyje (įskaitant tirpumą bandymo vandenyje) ir bandomosios medžiagos garų slėgis. Turi būti patikimas metodas ištirpinti bandomajai medžiagai kiekybiškai nustatyti žinomu tikslumu ir aptikimo riba, kurie nurodomi ataskaitoje.

Informaciją apie bandomąją medžiagą kuri yra vertinga bandymo sąlygoms nustatyti, sudaro struktūrinė formulė, medžiagos grynumas, stabilumas veikiant šviesai ir bandymo sąlygomis, pKa,  $P_{ow}$  ir lengvo biologinio skaidumo bandymo rezultatai (žr. C.4 metodą).

**1.5. BANDYMO TINKAMUMAS**

Bandymas yra tinkamas, jei tenkinamos šios sąlygos:

- bendras apvaisintų ikrų išgyvenamumas kontroliniuose bandiniuose ir, jei tinka, induose vien tik su tirpikliu turi būti didesnis arba lygus ribinėms vertėms, apibrėžtoms 2 ir 3 priedėliuose,
- ištirpusio deguonies koncentracija visą bandymą turi sudaryti 60–100 % oro prisotinimo vertės (ASV),
- kiekvienu bandymo momentu temperatūros verčių bandymo kameroje ar skirtingomis bandymo dienomis skirtumas turi būti ne didesnis kaip  $\pm 1,5$  °C ir temperatūra turėtų būti palaikoma bandymo rūšims nurodytu intervalu (2 ir 3 priedėliai).

**1.6. BANDYMO METODO APRAŠYMAS****1.6.1. Bandymo kameros**

Galima naudoti bet kokius stiklinius ar chemiškai inertiškos medžiagos indus. Indų matmenys turi būti gana dideli, kad atitiktų įkrovos sąlygas (žr. 1.7.1.2 skirsnį). Bandymo indus bandymo plote rekomenduojama išdėstyti atsitiktinai. Jei laboratorijoje yra sistemingi poveikiai, kuriuos būtų galima kontroliuoti suskirstant į blokus, indus geriau išdėstyti nevisiškai atsitiktinai, bet pagal randomizuotą blokinę schemą kiekviename bloke darant kiekvieną apdorojimą. Jei taikoma blokinė schema, į tai būtina atsižvelgti vėliau analizuojant duomenis. Bandymo kameros turi būti apsaugotos nuo nepageidautinų trikdžių.

**1.6.2. Žuvų rūšių parinkimas**

Rekomenduotos žuvų rūšys nurodytos 1A lentelėje. Tai netrukdo naudoti kitą rūšį (pavyzdžiai pateikti 1B lentelėje), bet, norint sudaryti tinkamas bandymo sąlygas, gali tekti pritaikyti bandymo metodiką. Šiuo atveju ataskaitoje turi būti pagrįstas rūšies parinkimo motyvas ir tyrimo metodas.

**1.6.3. Veislinių žuvų laikymas**

Detalių apie veislinių žuvų laikymą tinkamomis sąlygomis galima rasti OECD TG 210 <sup>(1)</sup> ir nuorodose (2) (3) (4) (5) (6).

**1.6.4. Embrijų ir lervų apdorojimas**

Embrijai 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 ikrai gali būti laikomi dėžėse ar tinkluose su pakankamai didelėmis akutėmis, kad išsiritusios lervos galėtų pro jas iškristi. Lervoms pernešti atliekant pusiau statinius bandymus su visišku kasdieniu atnaujinimu tinka Pastero pipetės (žr. 1.6.6 skirsnį).

Jei ikrų talpyklos, grotelės ar tinkleliai buvo naudojami ikrams pagrindiniame inde laikyti, šitos apribojimo priemonės turėtų būti pašalintos išsiritus lervoms, tačiau reikia palikti tinklelius, kurie neleistų ištrūkti žuvmims. Jei lervas reikia pernešti, jų neturi veikti oras, o žuvmims iš ikrų talpyklų pernešti neturi būti naudojami tinklai (tokia atsargumo priemonė gal ir nebūtina kai kurioms ne tokioms gležnomis rūšims, pvz., karpiumi). Šio pernešimo laikas įvairioms rūšims skirtingas ir pernešti nėra visuomet būtina. Taikant pusiau statinį metodą galima naudoti chemines stiklines ar negilias talpyklas ir, jei būtina, turinčias tinklo ekraną truputį pakeltą virš stiklinės dugno. Jei šių talpyklų tūris yra pakankamas, kad atitiktų įkrovos reikalavimus (žr. 1.7.1.2 skirsnį), embrijų ar lervų pernešti nebūtina.

**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

(<sup>1</sup>) OECD, Paris, 1992, Test Guideline 210, Fish, Early-life Stage Toxicity Test

neigiamo poveikio šiančių 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<sub>4</sub>), pesticidų (pvz., bendro fosforo organinių ir chloro organinių pesticidų kiekio), bendrosios organinės anglies ir suspenduotų kietųjų dalelių analizė turi būti atliekama, pavyzdžiui, kas tris mėnesius, jei žinoma, kad skiedimo vandens kokybė yra gana pastovi. Jei būtų parodyta, kad vandens kokybė yra pastovi bent metus, analizė gali būti atliekama ne taip dažnai, o intervalai padidinti (pvz., kas šešis mėnesius).

#### 1.6.6. Bandomieji tirpalai

Pasirinktos koncentracijos bandomieji tirpalai ruošiami skiedžiant pradinį tirpalą.

Pradinį tirpalą geriau ruošti bandomąją medžiagą tiesiog maišant ar purtant skiedimo vandenyje mechaninėmis priemonėmis (pvz., maišyklė ar ultragarsu). Pakankamai koncentruotam pradiniam tirpalui ruošti galima naudoti prisotinimo kolonėles (tirpumo kolonėles). Kiek įmanoma, reikia vengti naudoti tirpiklius ar dispergatorius (tirpinimo medžiagas); tačiau kartais, norint gauti tinkamos koncentracijos pradinį tirpalą tokias medžiagas gali tekti naudoti. Tinkami tirpikliai yra acetonas, etanolis, metanolis, dimetilsulfoksidas, dimetilformamidas ir trietilenglikolis. Tinkami dispergatoriai yra *Cremophor* RH40, Tween 80, 0,01 % metilceliuliozė ir HCO-40. Reikėtų atsargiai naudoti lengvai biologiškai įstancias medžiagas (pvz., acetoną) ir (ar) labai lakius junginius, nes, atliekant dinaminis bandymus, jie gali kelti problemų dėl bakterijų kaupimosi. Naudojama tirpinimo medžiaga neturi daryti reikšmingo poveikio išgyvenamumui ir neigiamo poveikio ankstyvosios stadijoms, kaip kad nustatoma atliekant kontrolinį bandymą vien tik su tirpikliu. Tačiau reikia kiek įmanoma stengtis tokių medžiagų nenaudoti.

Pusiau statiniam metodui galima taikyti dvi atnaujinimo metodikas: 1) nauji bandomosios medžiagos tirpalai paruošiami švariose induose ir gyvi likę ikrai bei lervos mažuose seno tirpalo tūriuose švelniai pernešami į naujus indus vengiant sąlyčio su oru; ar 2) bandomieji organizmai paliekami senuose induose, tačiau pakeičiama dalis (bent trys ketvirčiai) jų vandens. Terpės atnaujinimo dažnis priklausys nuo bandomosios medžiagos stabilumo, tačiau vandenį atnaujinti rekomenduojama kasdien. Jei pradiniai stabilumo bandymai (žr. 1.4 skirsnį) rodo, kad bandomosios medžiagos koncentracija laikotarpiu tarp atnaujinimų yra nestabili (t. y. yra už 80–120 % vardinės koncentracijos ribų ar yra mažesnė kaip 80 % išmatuotos pradinės koncentracijos), reikėtų numatyti dinaminio bandymo taikymą. Bet kuriuo atveju reikėtų pasirūpinti, kad atnaujinant vandenį lervos nepatirtų įtampos.

Bandomosios koncentracijos tirpalams į bandymo kameras tiekti atliekant dinaminis bandymus reikalinga sistema, kuri nepertraukiamai dozuotų ir skiestų bandomosios medžiagos pradinį tirpalą (pvz., dozavimo siurblys, proporcingasis skiestuvas, prisotinimo sistema). Pradinių tirpalų ir skiedimo vandens srautai turi būti kartais, geriau kasdien, tikrinami ir visą bandymą turi nekisti daugiau kaip 10 %. Tinkamas pasirodė esąs srautas, atitinkantis bent penkis bandymo kameros tūrius per 24 h (2).

#### 1.7. BANDYMO PROCEDŪRA

Vertingos informacijos, kaip atlikti žuvų embriono ir mailiaus su trynio maišeliu toksiško 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 kuomet 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 kuomet vienodžiau, nes kai kurias rūšis gali būti sunku gauti vienodas įkrovas) paskirstytų bent trims tos pačios koncentracijos bandymo kameroms. Įkrova (biomasė bandomojo tirpalo tūrio vienetui) turi būti pakankamai maža, kad be aeracijos ištirpusio deguonies koncentraciją

būtų galima palaikyti bent 60 % oro prisotinimo koncentracijos. Dinaminiais bandymams yra rekomenduota ne didesnė kaip 0,5 g/l per 24 h ir bet kuriuo momentu ne didesnė kaip 5 g/l tirpalo (2).

#### 1.7.1.3. Šviesa ir temperatūra

Apšvietimo laikotarpis ir vandens temperatūra turi atitikti žuvų rūšį (2 ir 3 priedėliai). Temperatūrai nuolat kontroliuoti gali būti patogu turėti papildomą bandymo indą.

#### 1.7.2. Bandomosios medžiagos koncentracijos

Paprastai reikia naudoti penkias bandomosios medžiagos koncentracijas, besiskiriančias pastoviu santykiu, geriausiai ne didesniu kaip 3,2. Renkantis koncentracijos verčių intervalą turi būti išnagrinėta ūmaus toksikumo tyrimų kreivė, siejanti  $LC_{50}$  ir veikimo trukmę. Tam tikromis aplinkybėmis gali pasiteisinti mažiau kaip penkių koncentracijos verčių naudojimas, pvz., atliekant ribinės koncentracijos vertės nustatymo bandymus, ar siauresnio koncentracijos verčių intervalo naudojimas. Mažiau kaip penkių koncentracijos verčių naudojimas turi būti pagrįstas. Medžiagos koncentracijos verčių, didesnių kaip 96 h  $LC_{50}$  ar 100 mg/l, žiūrint, kuri mažesnė, bandyti nebūtina. Neturėtų būti atliekami bandymai su koncentracijos vertėmis, didesnėmis kaip medžiagos tirpumo ribinė koncentracija.

Jei pradinio tirpalo ruošimui lengvinti naudojama tirpinimo medžiaga (žr. 1.6.6 skirsnį), jos galutinė koncentracija turi būti ne didesnė kaip 0,1 ml/l ir geriau, kai ji visuose bandymo induose būtų vienoda.

#### 1.7.3. Kontroliniai bandiniai

Be bandomosios serijos, turi būti vienas skiedimo vandens kontrolinis bandinys (su lygiagrečiais bandiniais, kai reikia) ir, jei tinka, vienas kontrolinis bandinys su tirpinimo medžiaga (su lygiagrečiais bandiniais, kai reikia).

#### 1.7.4. Kiekybinių analizių ir matavimų dažnis

Atliekant bandymą bandomosios medžiagos koncentracijų vertės nustatomos reguliariais tarpais.

Jei manoma, kad atliekant pusiau statinius bandymus bandomosios medžiagos koncentracija lieka vardinės koncentracijos  $\pm 20\%$  vertės (t. y. 80–120 % intervalo; žr. 1.4 ir 1.6.6 skirsnius), rekomenduojama mažiausiai tris kartus lygiais bandymo laiko tarpais nustatyti bent didžiausią ir mažiausią bandomąją koncentraciją iš karto po tirpalo paruošimo ir prieš pat jo atnaujinimą (t. y. tą patį tirpalą reikia analizuoti imant šviežio tirpalo bandinius ir prieš pat jo atnaujinimą).

Jei tai bandymai, kuriuos atliekant nesitikima, kad koncentracija liks lygi vardinei vertei  $\pm 20\%$  (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 tinkamai palaikoma  $\pm 20\%$  vardinės koncentracijos vertės ar išmatuotos pradinės koncentracijos vertės, rezultatai gali būti grindžiami vardine ar išmatuota vertėmis.

Atliekant 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.

Bandinius gali tekti filtruoti (pvz., per filtrą, kurio akių dydis 0,45  $\mu\text{m}$ ) ar centrifuguoti. Tačiau, kadangi nei centrifugavimu, nei filtravimu ne visuomet galima atskirti biologiškai neprieinamą bandomosios medžiagos dalį nuo biologiškai prieinamos dalies, bandinių apdorėjimas šiais būdais gali būti netaikomas.

Atliekant bandymą visuose bandymo induose turi būti matuojama ištirpusio deguonies koncentracija, pH ir temperatūra. Turi būti matuojamas kontrolinių bandinių ir vieno indo su didžiausios koncentracijos bandiniu bendras kietumas ir sūrumas (jei tinka). Mažiausiai ištirpusio deguonies koncentracija ir sūrumas (jei tinka) turi būti matuojami tris kartus (bandymo pradžioje, viduryje ir pabaigoje). Atliekant pusiau statinius bandymus ištirpusio deguonies koncentraciją rekomenduojama matuoti dažniau, geriau prieš kiekvieną

vandens atnaujinimą ir po jo ar bent kartą per savaitę. Atliekant pusiau statinius bandymus pH vertė turi būti matuojama prieš kiekvieną vandens atnaujinimą ir po jo, atliekant 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 bandinių. Embrioninių stadijų aprašymo ir iliustravimo pavyzdžių galima rasti literatūroje (2) (5) (10) (11).

##### 1.7.5.2. *Išsiritimas ir išgyvenamumas*

Išsiritimo ir išgyvenamumo stebėjimai turi būti daromi bent kasdien, o gauti skaičiai registruojami. Gali būti pageidautina bandymo pradžioje stebėti dažniau (pvz., pirmąsias tris valandas kas 30 minučių), nes kartais išgyvenamumo laikas gali būti svarbesnis nei vien tik žūčių skaičius (pvz., ūmaus toksiškumo atveju). Negyvi embrionai ir lervos turi būti pašalinti iš karto, kai tik bus pastebėti, nes jie greitai suyra. Šalinti reikėtų labai atsargiai, kad nebūtų užgauti ar fiziškai sužaloti šalia esantys ikrai/lervos, kadangi jie yra labai gležni ir jautrūs. Žūties kriterijai kinta pagal gyvenimo stadiją:

- *ikrams*: ypač ankstyvosiomis stadijomis, pastebimas permatomumo sumažėjimas ir spalvos pokytis dėl baltymo koaguliacijos ir (ar) nusėdimo, dėl to atsiranda baltas matinis atspalvis,
- *embrionams*: kūno judėjimo ir (ar) širdies plakimo nebuvimas ir (ar) matinio atspalvio atsiradimas rūšims, kurių embrionai yra normaliai permatomi,
- *lervoms*: nejudamumas ir (ar) kvėpavimo judėjimo, ir (ar) širdies plakimo nebuvimas, ir (ar) balta matinė centrinės nervų sistemos spalva ir (ar) reakcijos į mechaninius dirgiklius nebuvimas.

##### 1.7.5.3. *Nenormali išvaizda*

Kūno ir (ar) pigmentacijos anomalijų turinčių lervų skaičius ir trynio maišelio absorbcijos stadija turi būti registruojami atitinkamais laiko tarpais atsižvelgiant į bandymo trukmę ir į aprašytos anomalijos prigimtį. Pastebėtina, kad nenormalūs embrionai ir lervos pasitaiko natūraliai ir kai kurių rūšių gali sudaryti kelis kontrolinio (-ių) bandinio (-ių) procentus. Iš bandymo indų turi būti pašalinami tik nugaišę nenormalūs gyvūnai.

##### 1.7.5.4. *Nenormalus elgesys*

Anomalijos, pvz., hiperventiliacija, nekoordinuotas plaukimas ir netipiškas nejudamumas, turi būti registruojamos atitinkamais laiko tarpais atsižvelgiant į bandymo trukmę. Šie pastebėti poveikiai, nors juos sunku įvertinti kiekybiškai, gali padėti aiškinti gaištamumo duomenis, t. y. suteikti informacijos apie medžiagos toksinio veikimo būdą.

##### 1.7.5.5. *Ilgis*

Baigiant bandymą rekomenduojama išmatuoti atskirų gyvūnų ilgį; galima matuoti standartinį, ilgį iki uodegos peleko išsišakojimo ar bendrą ilgį. Tačiau jei supuvo uodegos pelekas ar yra išėstas, turi būti imamas standartinis ilgis. Paprastai, jei bandymas atliekamas teisingai, ilgio variacijos koeficientas 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 atliekamas teisingai, masės variacijos koeficientas lygiagrečiams kontroliniams bandiniams turi būti  $\leq 20\%$ .

Darant stebėjimus bus gauta dalis nurodytų duomenų ar visi duomenys, kuriems atliekama statistinė analizė:

- bendras gaištamumas,
- sveikų lervų skaičius bandymo pabaigoje,
- išsiritimo pradžia ir jo pabaiga (t. y. 90 % išsiritusių ikrų kiekviename vienodos koncentracijos inde),
- kiekvieną parą išsiritančių lervų skaičius,
- iki bandymo pabaigos išgyvenusių gyvūnų ilgis (ir masė),
- deformuotų ar nenormalios išvaizdos lervų skaičius,
- nenormalaus elgesio lervų skaičius.

## 2. DUOMENYS IR ATASKAITA

### 2.1. REZULTATŲ APDOROJIMAS

Rekomenduojama, kad rengiant bandymo schemą ir bandymą analizuojant dalyvautų statistikas, nes šis bandymo metodas leidžia smarkiai keisti eksperimento planą pvz., bandymo kamerų skaičių, bandomųjų koncentracijų skaičių, pradinį apvaisintų ikrų skaičių, matuojamų parametrų skaičių. Atsižvelgiant į bandymo schemos variantų įvairovę, jokių specialių nurodymų dėl statistinės metodikos čia nepateikiama.

Jei reikia įvertinti LOEC ar NOEC vertes, būtina analizuoti kiekvieno vienodos koncentracijos rinkinio duomenų sklaidą taikant dispersinę analizę (ANOVA) ar faktorinės analizės lenteles. Norint daryti atskiros koncentracijos ir kontrolinių bandinių gautų rezultatų visuotinę 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 parametruota (-os) taip, kad nustatomos LC ar  $EC_x$  vertės ir jų standartinė paklaida galėtų būti įvertintos tiesiogiai. Tai labai palengvina LC ar  $EC_x$  pasiklivimo ribų apskaičiavimą. Jei nėra svarbių priežasčių pirmenybę teikti kitiems pasiklivimo lygmenims, turi būti nurodomas dvipusis 95 % pasiklivimo intervalas. Pageidautina, kad pritaikymo metodikoje būtų numatytos priemonės atitikimo stokes reikšmingumui įvertinti. Galima taikyti grafinius kreivių pritaikymo metodus. Regresinė analizė tinka visiems 1.7.5.6 skirsnyje išvardytiems stebėjimams.

### 2.2. REZULTATŲ AIŠKINIMAS

Rezultatai turi būti aiškinami atsargiai, jei matuojamos bandomųjų tirpalų toksinių medžiagų koncentracijos vertės yra arti analizės metodo aptikimo ribos. Taip pat labai atsargiai reikėtų aiškinti rezultatus, gautus koncentracijos vertėms, didesnėms kaip medžiagos tirpumo vandenyje vertės.

### 2.3. BANDYMO ATASKAITA

Bandymo ataskaitoje turi būti pateikta ši informacija:

#### 2.3.1. Bandomoji medžiaga:

- fizikinė būseną ir atitinkamos fizikinės ir cheminės savybės,
- cheminio identifikavimo duomenys, įskaitant grynumą, ir, jei tinka, analizės metodas bandomajai medžiagai kiekybiškai nustatyti.



**2.3.2. Bandomieji gyvūnai:**

- mokslinis pavadinimas, veislė, motininių žuvų skaičius (t. y. kiek moteriškos lyties žuvų buvo naudojama bandymui reikalingų ikrų skaičiui gauti), apvaisintų ikrų surinkimo šaltinis ir metodas ir vėlesnis apdorojimas.

**2.3.3. Bandymo sąlygos:**

- taikytas bandymo metodas (pvz., pusiau statinis ar dinaminis, laikas nuo apvaisinimo iki bandymo pradžios, įkrova ir t. t.),
- apšvietimo laikotarpio (-ių) trukmė,
- bandymo schema (pvz., bandymo indų skaičius ir lygiagrečių bandinių skaičius, embrionų skaičius vienam lygiagrečiam bandiniui),
- pradinių tirpalų ruošimo metodas ir jų atnaujinimo dažnis (jei naudojama tirpinimo medžiaga, turi būti nurodyta jos koncentracija),
- vardinės bandomosios koncentracijos, išmatuotos bandymo indų tirpalų koncentracijos vertės, jų vidutinės vertės, standartiniai nuokrypiai ir nustatymo metodas; jei bandomoji medžiaga tirpsta esant mažesnei koncentracijai nei išmatuotos koncentracijos, įrodymai, kad buvo matuojama ištirpintos bandomosios medžiagos koncentracija tirpale,
- skiedimo vandens charakteristikos: pH, kietumas, šarmingumas, temperatūra, ištirpusio deguonies koncentracija, liekamojo chloro lygiai (jei matuoti), bendroji organinė anglis, suspenduotos kietosios dalelės, bandymo terpės sūrumas (jei matuotas) ir visi kiti daryti matavimai,
- bandymo indų vandens kokybė: pH, kietumas, temperatūra ir ištirpusio deguonies koncentracija.

**2.3.4. Rezultatai:**

- visų parengiamųjų bandomosios medžiagos stabilumo tyrimų rezultatai,
- įrodymai, kad kontroliniai bandiniai atitinka bendro bandomosios rūšies išgyvenamumo priimtino standartą (2 ir 3 priedėliai),
- embriono ir lervos stadijos žuvų gaištamumo/išgyvenamumo ir bendro gaištamumo/išgyvenamumo duomenys,
- ikrų inkubavimo parų skaičius ir išsiritusių lervų skaičius,
- ilgio (ir masės) duomenys,
- morfologinių anomalijų, jei yra, dažnis ir aprašymas,
- poveikio elgesiui, jei yra, dažnumas ir aprašymas,
- duomenų statistinė analizė ir apdorojimas,
- jei bandymo duomenims buvo taikoma dispersinė analizė, kiekvieno įvertinto atsako mažiausia pastebimą poveikį sukianti koncentracija (LOEC), kai  $p = 0,05$ , ir nepastebėto poveikio koncentracija (NOEC), įskaitant taikytų statistinių metodikų aprašymą ir nuorodą, kokio dydžio poveikis gali būti aptiktas,
- jei bandymo duomenims buvo taikomas regresinės analizės metodas, LC ir EC<sub>x</sub> jų pasiklivimo 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, Fat-head 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 Westernman 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.
- 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.

## 1 A lentelė

**BANDYMU REKOMENDUOJAMOS ŽUVŲ RŪŠYS**

## GĖLAVANDENĖS

*Oncorhynchus mykiss*

Vaivorykštinis upėtakis (9)(16)

*Danio rerio*

Zebrinė danija (7)(17)(18)

*Cyprinus caprio*

Paprastasis karpis (8)(19)

*Oryzias latipes*

Japoninė medaka (20)(21)

*Pimephales promelas*

Juodoji drūtgalvė rainė (8)(22)

## 1 B lentelė

**Kitų dokumentais tinkamai patvirtintų naudotų rūšių pavyzdžiai**

GĖLAVANDENĖS	SŪRIAVANDENĖS (JŪRŲ)
<i>Carassius auratus</i>	<i>Menidia peninsulae</i>
Sidabrinis karosas (8)	Menidija (23)(24)(25)
<i>Lepomis macrochirus</i>	<i>Clupea harengus</i>
Melsvažiaunis saulešeris (8)	Atlantinė silkė (24)(25)
	<i>Gadus morhua</i>
	Atlantinė menkė (24)(25)
	<i>Cyprinodon variegatus</i>
	Lėlžuvė (23)(24)(25)

## 1 priedėlis

**TOKSIŠKUMO ZEBRINĖS DANIJOS (BRACHYDANIO RERIO)  
EMBRIONUI IR MAILIUI SU TRYNIO MAIŠELIU BANDYMO REKOMENDACIJOS**

## ĮVADAS

Zebrinė danija yra Indijos *Coromandel* pakrančių žuvis, gyvenanti srauniose upėse. Tai yra paplitusi karpių šeimos akvariumų žuvis, informacijos apie jos priežiūros ir auginimo būdus galima rasti standartiniuose žinyuose apie tropikų žuvis. Žuvis 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 ikras yra išneršiamas, jie iškart apvaisinami. Ikras, būdamas permatomas ir nelipnūs, krenta į dugną, kur juos gali suryti tėvai. Nerštui įtakos turi apšvietimas. Jei rytą šviesos pakanka, žuvis paprastai neršia anksti, kai tik išaušta.

Patelė gali neršti kelių šimtų ikrų partijomis kas savaitę.

## MOTININIŲ ŽUVŲ BŪSENA. REPRODUKCIJA IR ANKSTYVOSIOS GYVENIMO STADIJOS

Parinkite atitinkamą skaičių sveikų žuvų ir prieš numatytą neršto laiką bent dvi savaites laikykite tinkamame vandenyje (pvz., 4 priedėlis). Žuvų grupei turi būti leista bent kartą neršti prieš ruošiant bandymui skirtų ikrų partiją. Žuvų tankis šiuo laikotarpiu turi būti ne didesnis kaip 1 gramas žuvų litrui vandens. Tankis gali būti didesnis, jei vanduo keičiamas reguliariai ar naudojamos valymo sistemos. Temperatūra rezervuaruose turi būti  $25 \pm 2$  °C. Žuvis turėtų būti šeriamas 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 įjungama silpna šviesa. Po neršto praėjus 2–4 valandoms, padėklas išimamas ir surenkami ikras. Padėklas nerštui neleidžia žuvis suryti ikrų, be to, palengvina jų surinkimą. Žuvų grupei turi būti leista bent kartą neršti prieš ruošiant bandymui skirtų ikrų partiją.
- 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 išjungama ir stengiamasi kiek įmanoma netrikdyti rezervuare esančių žuvų. Rytą nerštui pradėti įjungama silpna šviesa. Po 2–4 valandų žuvis išimamos ir surenkami ikras. Jei ikrų reikia daugiau nei gali išneršti viena patelė, lygiagrečiai galima įrengti pakankamą skaičių rezervuarų. Jei prieš bandymą buvo registruota kiekvienos patelės reprodukcijos geba (partijos dydis ir kokybė), nerštui galima atrinkti geriausios reprodukcijos gebos pateles.

Ikrai turi būti pernešti į bandymo indus naudojant stiklinius vamzdelius (vidinis skersmuo ne mažesnis kaip 4 mm), turinčius lanksčias siurbimo kriaušes. Su ikrais pernešamo vandens turi būti kuo mažiau. Ikrai yra sunkesni už vandenį ir iškrenta iš vamzdelio. Reikia žiūrėti, kad ikrams (ir lervoms) nepatektų oro. Siekiant užtikrinti, kad pradinėse vystymosi stadijose nebūtų nukrypimų nuo normos, ikrų partijų ėminiai turi būti ištirti mikroskopu. Ikrų dezinfekuoti negalima.

Ikrų daugiausia žūva per pirmąsias 24 h po apvaisinimo. Šiuo laikotarpiu dažnai jų žūva 5–40 %. Ikrai išsigimsta dėl nesėkmingo apvaisinimo ar dėl nenormalaus vystymosi. Atrodo, kad ikrų partijos kokybė priklauso nuo patelių, nes kai kurios patelės visą laiką neršia geros kokybės ikrus, o kitoms tai niekuomet nepavyksta. Skiriasi ikrų partijų vystymosi greitis ir išsiritimo trukmė. Sėkmingai apvaisintų ikrų ir lervų su trynio maišeliu išliekamumas yra geras, paprastai didesnis kaip 90 %. Esant 25 °C temperatūrai lervos išsirta per 3–5 paras po apvaisinimo, o trynio maišelis absorbuojamas maždaug per 13 parų po apvaisinimo.

Embrioninį vystymąsi gerai aprašė Hisaoka ir Battle (2). Dėl ikrų ir išsiritusių lervų permatomumo žuvies vystymąsi galima sekti ir pastebėti išsigimimus. Praėjus maždaug keturioms valandoms po neršto neapvaisintus ikrus galima atskirti nuo apvaisintų (3). Šiam tyrimui ikrai ir lervos dedami į mažo tūrio bandymo indus ir tiriami mikroskopu.

Ankstyvosioms gyvenimo stadijoms taikomos bandymo sąlygos išvardytos 2 priedėlyje. Optimalios praskiedimo vandens pH ir kietumo vertės yra atitinkamai lygios 7,8 ir 250 mg CaCO<sub>3</sub>/l.

#### APSKAIČIAVIMAI IR STATISTIKA

Siūlomas dviejų stadijų metodas. Iš pradžių statistiškai analizuojamas gaištamumas, nenormalaus vystymosi ir išsiritimo trukmės duomenys. Vėliau toms koncentracijoms, kurioms esant neigiamo poveikio šiems parametrams nebuvo aptikta, statistiškai įvertinamas kūno ilgis. Siūloma taikyti šį metodą, nes nuo toksiškos medžiagos gali selektyviai žūti kai kurios mažesnės 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 tinkamumas.

#### LC<sub>50</sub> IR EC<sub>50</sub> NUSTATYMAS

Išgyvenusių ikrų ir lervų procentinė dalis darant pataisą dėl gaištamumo kontroliniuose bandiniuose apskaičiuojama pagal *Abbotto* formulę (4):

$$P = 100 - \left( \frac{(C - P')}{(C)} \times 100 \right)$$

čia,

P	=	Pataisytas išgyvenamumas %
P'	=	bandomajai koncentracijai stebėta išgyvenamumo vertė %
C	=	kontroliniams bandiniams stebėta išgyvenamumo vertė %

Jei įmanoma, bandymo pabaigoje tinkamu metodu nustatoma LC<sub>50</sub>.

Jei vertinant EC<sub>50</sub> 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 BANDYMO SĄLYGOS, TRUKMĖ IR IŠGYVENAMUMO KRITERIJAI

Rūšis	Temp eraturą (°C)	Sūrumas (0/00)	Apšvietimo trukmė (valandos)	Stadijų trukmė (paros)		Tipiška bandymo trukmė	Išgyvenamumas kontroliniuose bandiniuose (ne mažesnis kaip %)	
				Embriūnas	Maišelis su trynio maišeliu		Išsiritimo sėkmė	Po išsiritimo
GĖLAVANDENĖS								
<i>Brachydanio rerio</i> Zebrinė danija	25 ± 1	—	12–16	3–5	8–10	Kiek įmanoma greičiau po apvaisinimo (ankstyvoji gastrulės stadija) iki 5 parų po išsiritimo (8–10 parų)	80	90
<i>Oncorhynchus mykiss</i> Vaivorykštinis upėtakis	10 ± 1 <sup>(1)</sup> 12 ± 1 <sup>(2)</sup>	—	0 <sup>(3)</sup>	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> Japoninė medaka	24 ± 1 <sup>(1)</sup> 23 ± 1 <sup>(2)</sup>	—	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> Juodoji drūtagalvė rainė	25 ± 2	—	16	4–5	5	Kiek įmanoma greičiau po apvaisinimo (ankstyvoji gastrulės stadija) iki 4 parų po išsiritimo (8–9 paros)	60	70

<sup>(1)</sup> Embriūnas<sup>(2)</sup> Lervoms<sup>(3)</sup> Embriūnas 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 bandymo sąlygos, trukmė ir išgyvenamumo kriterijai

Rūšis	Temperatūra (°C)	Sūrumas (0/00)	Apšvietimo trukmė (valandos)	Stadijų trukmė (paros)		Tipiška embriono ir mailiaus sutrynio maišelių bandymo trukmė	Kontrolinių bandinių išgyvenamumas (ne mažesniskaip %)	
				Embrionas	Mailiaus sutrynio maišelių bandym as		Išsiritimo sėkmė	Poišsiritimo
GĖLAVANDENĖS								
<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>Lepomis macrochirus</i> Melsvažiaunis saulešeris	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> Priekrantinė menidija	22–25	15–22	12	1,5	10	Kiek įmanoma greičiau po apvaisinimo (ankstyvoji gastrulės stadija) iki 5 parų po išsiritimo (6–7 paros)	80	60
<i>Clupea harengus</i> Atlantinė silkė	10 ± 1	8–15	12	20–25	3–5	Kiek įmanoma greičiau po apvaisinimo (ankstyvoji gastrulės stadija) iki 3 parų po išsiritimo (23–27 paros)	60	80
<i>Gadus morhua</i> Atlantinė menkė	5 ± 1	5–30	12	14–16	3–5	Kiek įmanoma greičiau po apvaisinimo (ankstyvoji gastrulės stadija) iki 3 parų po išsiritimo (18 parų)	60	80
<i>Cyprinodon variegatus</i> Lėlžuvė	25 ± 1	15–30	12	—	—	Kiek įmanoma greičiau po apvaisinimo (ankstyvoji gastrulės stadija) iki 4/7 parų po išsiritimo (28 paros)	> 75	80

## 4 PRIEDĖLIS

## KAI KURIOS TINKAMO SKIEDIMO VANDENS CHEMINĖS CHARAKTERISTIKOS

Medžiaga	Koncentracija
Kietosios dalelės	< 20 mg/l
Bendroji organinė anglis	< 2 mg/l
Nejonizuotas amoniakas	< 1 µg/l
Liekamasis chloras	< 10 µg/l
Bendras fosforo organinių pesticidų kiekis	< 50 ng/l
Bendras chloro organinių pesticidų ir polichlorintų bifenių kiekis	< 50 ng/l
Bendras organinis chloras	< 25 ng/l



**C.16. NAMINĖS BITĖS. ŪMUS TOKSIŠKUMAS PER VIRŠKINAMĄJĮ TRAKTĄ****1. METODAS**

Šis ūmaus toksiškumo bandymo metodas yra OECD TG 213 (1998) kopija.

**1.1. ĮVADAS**

Šis toksiškumo bandymas yra laboratorinis metodas, skirtas įvertinti augalų apsaugos priemonių ir kitų cheminių medžiagų ūmų toksiškumą per virškinamąjį traktą suaugusioms naminėms bitėms darbininkėms.

Vertinant ir nustatant cheminių medžiagų toksiškumo charakteristikas, gali būti reikalinga nustatyti ūmų toksiškumą per virškinamąjį traktą naminėms bitėms, pvz., kai galimas naminių bičių veikimas chemine medžiaga. Ūmaus toksiškumo per virškinamąjį traktą bandymas atliekamas norint nustatyti pesticidų ir kitų cheminių medžiagų būdingą toksiškumą bitėms. Šio bandymo rezultatai turėtų būti naudojami pesticidų pavojaus bitėms vertinimo programose pagal seką nuo laboratorinių toksiškumo bandymų iki bandymų pusiau lauko ir lauko sąlygomis (1). Pesticidai gali būti bandomi kaip veikliosios medžiagos (v. m.) ar kaip preparatai.

Turi būti vartojamas toksiškumo etalonas bičių jautrumui ir bandymo metodo preciziškumui tikrinti.

**1.2. APIBRĖŽTYS**

**Ūmus toksiškumas per virškinamąjį traktą** – neigiamas poveikis, kuris pasireiškia ne vėliau kaip po 96 valandų (h) davus vienkartinę bandomosios medžiagos dozę.

**Dozė** – suvartotos medžiagos kiekis. Dozė išreiškiama kaip bandomosios medžiagos masė ( $\mu\text{g}$ ) vienam bandomajam gyvūnui ( $\mu\text{g}/\text{bitei}$ ). Tikroji dozė kiekvienai bitei negali būti apskaičiuota, nes bitės šeriamos kartu, tačiau galima įvertinti vidutinę dozę (bendras bandomosios medžiagos suvartotas kiekis/bandomųjų bičių skaičius viename narvelyje).

**Oralinė  $LD_{50}$  (vidutinė mirtina dozė)** – yra statistškai apskaičiuota vienkartinė medžiagos dozė, kurią duodant per virškinamąjį traktą gali žūti 50 % gyvūnų.  $LD_{50}$  vertė yra išreiškiama ( $\mu\text{g}$ ) bandomosios medžiagos vienai bitei. Jei tai pesticidai, bandomoji medžiaga gali būti veiklioji medžiaga (v. m.) ar preparatas, kuriame yra viena ar daugiau kaip viena veiklioji medžiaga.

**Mirštamumas** – gyvūnas registruojamas kaip žuves, kai jis visiškai nejuda.

**1.3. BANDYMO METODO PRINCIPAS**

Taikant tam tikrą dozių intervalą, suaugusios naminės bitės darbininkės (*Apis mellifera*) yra veikiamos sacharozės tirpale ištirpinta bandomąja medžiaga. Toliau bitės maitinamos tuo pačiu maistu be bandomosios medžiagos. Mirštamumas registruojamas kasdien bent 48 h ir lyginamas su mirštamumu kontroliniuose bandiniuose vertėmis. Jei mirštamumas didėja 24–48 h laikotarpiu, o mirštamumas kontroliniuose bandiniuose lieka priimtino lygio, t. y.  $\leq 10\%$ , bandymą reikia tęsti ne ilgiau kaip iki 96 h. Rezultatai analizuojami  $LD_{50}$  po 24 h ir 48 h, o jei bandymas tęsiamas, po 72 h ir 96 h apskaičiuoti.

**1.4. BANDYMO TINKAMUMAS**

Bandymas yra tinkamas, jei tenkinamos šios sąlygos:

- baigiant bandymą vidutinis mirštamumas visuose kontroliniuose bandiniuose turi būti ne didesnis kaip 10 %,
- toksiškumo etalono  $LD_{50}$  atitinka apibrėžtą intervalą.

## 1.5. BANDYMO METODO APRAŠYMAS

### 1.5.1. Bičių rinkimas

Turi būti naudojamos jaunos suaugusios tos pačios veislės bitės darbininkės, t. y. to paties amžiaus, vienos 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 atliekami anksti pavasarį ar vėlai rudenį, bitės gali būti užaugintos inkubatoriuje ir vieną savaitę maitinamos bičių duonele (nuo korio surinktomis žiedadulkėmis) ir sacharozės tirpalu. Bitės, apdorotos cheminėmis medžiagomis, pvz., antibiotikais, preparatais varaozei gydyti ir t. t., toksiškumo bandymams neturėtų būti naudojamos, jei po apdorojimo paskutinį kartą dar nėra praėję keturių savaičių.

### 1.5.2. Laikymo ir maitinimo sąlygos

Naudojami lengvai plaujami ir gerai vėdinami narveliai. Galima naudoti bet kurios tinkamos medžiagos, pvz., nerūdijančio plieno, vielos tinklelio, plastiko, vienkartinius medinius narvelius ir t. t. Geriau naudoti 10 bičių vienam narveliui grupes. Narvelių dydis turi atitikti bičių skaičių, t. y. joms reikia palikti pakankamai vietos.

Bitės bandymo patalpoje turi būti laikomos tamsoje esant  $25 \pm 2$  °C temperatūrai. Santykinis drėgnumas, paprastai apie 50–70 %, turi būti registruojamas per visą bandymą. Bičių tvarkymo procedūras, įskaitant apdorojimą ir stebėjimus, galima daryti (dienos) šviesoje. Maistą sudaro sacharozės vandeninis tirpalas, kurio galutinė koncentracija yra 500 g/l (50 % w/v). Sudavus bandymo dozes maitinama pasirinktinu laiku. Maitinimo įtaisais turi leisti registruoti maisto tiekimą į kiekvieną narvelį. Galima naudoti stiklinį mėgintuvėlį (maždaug 50 mm ilgio ir 10 mm pločio, kurio atviras galas susiaurinamas maždaug iki 2 mm skersmens).

### 1.5.3. Bičių ruošimas

Surinktos bitės yra atsitiktinai paskirstomos į bandymo narvelius, kurie atsitiktinai išdėstomi bandymo patalpoje.

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 1 % ir didesnės naudoti nereikėtų.

Turi būti paruošti atitinkami kontroliniai tirpalai, t. y. jei bandomajai medžiagai tirpinti naudojamas tirpiklis ar dispergatorius, turi būti naudojamos dvi atskiros kontrolinių bandinių grupės: vienas dozavimo tirpalų koncentracijos tirpiklio/nešiklio tirpalas vandenyje ir vienas sacharozės tirpale.

## 1.6. BANDYMO PROCEDŪRA

### 1.6.1. Bandymų ir kontrolinės grupės

Dozių ir lygiagrečių bandinių skaičius turi atitikti statistinius  $LD_{50}$  nustatymo reikalavimus esant 95 % pasiklovimo riboms. Paprastai bandymui reikia penkių  $LD_{50}$  intervalo dozių, išdėstytų pagal geometrinę progresiją, kurios koeficientas būtų ne didesnis kaip 2,2. Tačiau skiedimo faktorius ir dozavimui naudojamų koncentracijų skaičius turi būti nustatyti pagal toksiškumo kreivės (mirtingumas kaip dozės funkcija) krypties koeficientą ir atsižvelgiant į rezultatams analizuoti pasirinktą statistinį metodą. Dozavimui tinkamas koncentracijas galima pasirinkti pagal intervalo nustatymo bandymo rezultatus.

Kiekvienos bandymo koncentracijos dozę turi gauti ne mažiau kaip trys bandymų grupės po 10 bičių. Be bandomosios serijos, turi būti bandomos ne mažiau kaip trys kontrolinės grupės po 10 bičių. Kontrolinės grupės taip pat turi būti įtrauktos ir naudojamiems tirpikliams/nešikliams (žr. 1.5.4 skirsnį).

**1.6.2. Toksiškumo etalonas**

Į bandymų seriją turi būti įtrauktas toksiškumo etalonas. Kiekvienai bandomajai dozei turėtų būti bent trys narveliai su 10 bičių kiekviename narvelyje. Kaip toksiškumo etaloną geriau naudoti dimetoatą, kuriam literatūroje nurodytas oralinės LD<sub>50</sub> 24 h vertės intervalas yra 0,10–0,35 µg veikliosios medžiagos vienai bitei (2). Tačiau būtų priimtini ir kiti toksiškumo etalonai, jei būtų pateikta pakankamai duomenų laukiamam atsakui į dozės poveikį patikrinti (pvz., parationas).

**1.6.3. Veikimas****1.6.3.1. Dozių davimas**

Kiekvienai bičių bandymo grupei turi būti duodama 100–200 µl 50 % sacharozės vandeninio tirpalo, kuriame būtų reikiamos koncentracijos bandomoji medžiaga. Blogai tirpiems, mažo toksiškumo produktams ar mažos koncentracijos preparatams reikalingas didesnis tūris, nes turi būti sunaudota didesnė sacharozės tirpalo dalis. Turi būti kontroliuojamas grupės suvartotas apdoroto maisto kiekis. Maistą suvartojus (paprastai per 3–4 h), maitinimo įtaisas turi būti pašalintas iš narvelio ir pakeistas maitinimo įtaisu vien tik su sacharozės tirpalu. Toliau sacharozės tirpalai duodami pasirinktinu laiku. Esant kai kurių junginių didesnei koncentracijai, maisto gali būti suvartota mažai arba bitės gali jį visiškai atmesti. Ne vėliau kaip po 6 h nesuvartotas apdorotas maistas turi būti pakeistas vien tik sacharozės tirpalu. Turi būti įvertintas nesuvartoto apdoroto maisto kiekis (pvz., matuojant nesuvartoto apdoroto maisto tūrį arba masę).

**1.6.3.2. Trukmė**

Geriausia bandymo trukmė po to, kai bandomasis tirpalas pakeičiamas vien tik sacharozės tirpalu, yra 48 h. Jei mirštamumas po pirmųjų 24 h vis dar didėja daugiau kaip 10 %, bandymo trukmė turi būti prailginta ne daugiau kaip iki 96 h, jei mirštamumas kontroliniuose bandiniuose yra ne didesnis kaip 10 %.

**1.6.4. Stebėjimai**

Mirštamumas registruojamas po 4 h nuo bandymo pradžios, o vėliau po 24 h ir 48 h (t. y. po dozės davimo). Jei reikalingas prailgintas stebėjimo laikotarpis, tolesni vertinimai turi būti daromi kas 24 h ne ilgiau kaip iki 96 h, jei mirštamumas kontroliniuose bandiniuose yra ne didesnis kaip 10 %.

Turi būti įvertintas grupės suvartoto maisto kiekis. Apdoroto ir neapdoroto maisto vartojimo greičio per 6 h lyginimas gali suteikti informacijos apie apdoroto maisto priimtinumą.

Turi būti registruojami visi bandymo metu pastebėti neįprasto elgesio reiškiniai.

**1.6.5. Ribinis bandymas**

Kartais (pvz., kai manoma, kad bandomosios medžiagos toksiškumas turėtų būti mažas) galima atlikti ribinį bandymą naudojant 100 µg veikliosios medžiagos vienai bitei, taip norint parodyti, kad LD<sub>50</sub> yra didesnė už šią vertę. Turi būti naudojama ta pati metodika, įskaitant tris lygiagrečius bandymų grupes bandomajai dozei, atitinkamus kontrolinius bandinius ir toksiškumo etaloną. Jei pasitaiko mirties atvejų, turi būti daromas visas tyrimas. Jei pastebimi subletalūs poveikiai (žr. 1.6.4 skirsnį), jie turi būti užregistruoti.

**2. DUOMENYS IR ATASKAITA****2.1. DUOMENYS**

Duomenys turėtų būti apibendrinti lentelių pavidalu, kiekvienos dozės grupei, taip pat kontrolinių bandinių ir toksiškumo etalono grupėms nurodant naudotų bičių skaičių, mirštamumą kiekvienu stebėjimo momentu ir neįprastai besielgiančių bičių skaičių. Mirštamumo duomenis analizuokite atitinkamais analizės metodais (pvz., probito funkcijos analizė, slenkamasis vidurkis, binominio skirstinio tikimybė) (3) (4). Nubraižykite atsako, kaip dozės funkcijos, kreives kiekvienam rekomenduotam stebėjimo momentui ir apskaičiuokite kreivių krypties koeficientus ir vidutines mirtinas dozes (LD<sub>50</sub>) su 95 % pasiklovimo ribomis. Galima padaryti pataisą dėl mirštamumo kontroliniuose bandiniuose naudojant Abbotto pataisą (4) (5). Jei apdorotas maistas suvartojamas nevisiškai, turi būti nustatyta grupės suvartota bandomosios medžiagos dozė. LD<sub>50</sub> turi būti išreikšta µg bandomosios medžiagos vienai bitei.

## 2.2. BANDYMO ATASKAITA

Bandyimo ataskaitoje turi būti ši informacija:

### 2.2.1. **Bandomoji medžiaga:**

- fizikinė būsena ir atitinkamos fizikinės ir cheminės savybės (pvz., stabilumas vandenyje, garų slėgis),
- cheminio identifikavimo duomenys, įskaitant struktūrinę formulę, grynumą (t. y. pesticidams – identiškas ir veikliosios (-ųjų) medžiagos (-ų) koncentracija).

### 2.2.2. **Bandomieji gyvūnai:**

- mokslinis pavadinimas, veislė, apytikris amžius (savaitėmis), rinkimo būdas, rinkimo data,
- informacija apie bandymų bičių rinkimui naudotas kolonijas, įskaitant sveikatą, visas suaugusių bičių ligas, prieš tai taikytą apdorojimą ir t. t.

### 2.2.3. **Bandyimo sąlygos:**

- bandymo patalpos temperatūra ir santykinis drėgnis,
- laikymo sąlygos, įskaitant narvelių tipą, dydį ir medžiagą,
- pradinių ir bandomųjų tirpalų ruošimo būdai (turi būti nurodytas tirpiklis, jei naudojamas, ir jo koncentracija),
- bandymo schema, pvz., naudotos bandomosios koncentracijos ir jų skaičius, kontrolinių bandinių skaičius; kiekvienai bandomajai koncentracijai ir kontroliniam bandiniui naudotų narvelių skaičius ir bičių skaičius viename narvelyje,
- bandymo data.

### 2.2.4. **Rezultatai:**

- parengtinio intervalo nustatymo tyrimo, jei darytas, rezultatai,
- neapdoroti duomenys: mirštamumas po kiekvienos bandytos dozės ir kiekvienu stebėjimo momentu,
- dozės ir atsako kreivių brėžinys baigiant bandymą,
- bandomosios medžiagos ir toksiškumo etalono LD<sub>50</sub> vertės su 95 % pasiklivimo ribomis, nustatytos kiekvienu rekomenduotu stebėjimo momentu,
- LD<sub>50</sub> nustatymui taikyti statistiniai metodai,
- mirštamumas kontroliniuose bandiniuose,
- kitas stebėtas ar išmatuotas biologinis poveikis, pvz., bičių neįprastas elgesys (įskaitant bandomosios dozės atmetimą), maisto vartojimo greitis apdorotų ir neapdorotų bičių grupėse,
- visi nukrypimai nuo čia aprašytų bandymo metodikų ir visa kita susijusi informacija.

## 3. NUORODOS

- 1) EPPO/Council of Europe (1993). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Products – Honeybees. EPPO bulletin, vol. 23, N.1, 151–165. March 1993.

- 2) Gough, H. J., 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.

## C.17. NAMINĖS BITĖS – ŪMAUS KONTAKTINIO TOKSIŠKUMO BANDYMAS

## 1. METODAS

Sis ūmaus toksiškumo bandymo metodas yra OECD TG 214 (1998) kopija.

## 1.1. ĮVADAS

Šis toksiškumo bandymas yra laboratorinis metodas, skirtas įvertinti augalų apsaugos priemonių ir kitų cheminių medžiagų ūmų kontaktinį toksiškumą suaugusioms naminėms bitėms darbininkėms.

Vertinant ir nustatant cheminių medžiagų toksiškumo charakteristikas, gali būti reikalinga nustatyti ūmų kontaktinį toksiškumą naminėms bitėms, pvz., kai yra galimas naminių bičių veikimas chemine medžiaga. Ūmaus toksiškumo per virškinamąjį traktą bandymas atliekamas norint nustatyti pesticidų ir kitų cheminių medžiagų būdingą toksiškumą bitėms. Šio bandymo rezultatai turėtų būti naudojami pesticidų pavojaus bitėms vertinimo programose pagal seką nuo laboratorinių toksiškumo bandymų iki bandymų pusiau lauko ir lauko sąlygomis (1). Pesticidai gali būti bandomi kaip veikliosios medžiagos (v. m.) ar kaip preparatai.

Turi būti vartojamas toksiškumo etalonas bičių jautrumui ir bandymo metodo preciziškumui tikrinti

## 1.2. APIBRĖŽTYS

**Ūmus kontaktinis toksiškumas** – neigiamas poveikis, kuris pasireiškia ne vėliau kaip per 96 h po vienkartinės bandomosios medžiagos dozės vietinio uždėjimo.

**Dozė** – uždėtos medžiagos kiekis. Dozė yra išreiškiama kaip bandomosios medžiagos masė ( $\mu\text{g}$ ) vienam bandomajam gyvūnui ( $\mu\text{g}/\text{bitei}$ ).

**Kontaktinė  $LD_{50}$  (vidutinė mirtina dozė)** – yra statistiškai apskaičiuota vienkartinė medžiagos dozė, kurią naudojant gali žūti 50 % gyvūnų.  $LD_{50}$  vertė yra išreiškiama ( $\mu\text{g}$ ) bandomosios medžiagos vienai bitei. Jei tai pesticidai, bandomoji medžiaga gali būti veiklioji medžiaga (v. m.) ar preparatas, kuriame yra viena ar daugiau kaip viena veiklioji medžiaga.

**Mirštamumas** – gyvūnas registruojamas kaip žuvęs, kai jis visiškai nejuda.

## 1.3. BANDYMO METODO PRINCIPAS

Taikant tam tikrą dozių intervalą, suaugusios naminės bitės darbininkės (*Apis mellifera*) yra veikiamos tinkamame nešiklyje ištirpinta bandomąja medžiaga ją tiesiogiai užlašinant ant krūtinės (lašeliais). Bandymo trukmė yra 48 h. Jei mirštamumas per 24–48 h didėja, o mirštamumas kontroliniuose bandiniuose lieka priimtino lygio, t. y. < 10 %, bandymą reikia tęsti ne ilgiau kaip iki 96 h. Mirštamumas registruojamas kasdien ir lyginamas su mirštamumo kontroliniuose bandiniuose vertėmis. Rezultatai yra analizuojami  $LD_{50}$  po 24 h ir 48 h, o jei bandymas yra tęsiamas, po 72 h ir 96 h apskaičiuoti.

## 1.4. BANDYMO TINKAMUMAS

Bandymas yra tinkamas, jei tenkinamos šios sąlygos:

- baigiant bandymą vidutinis mirštamumas visuose kontroliniuose bandiniuose turi būti ne didesnis kaip 10 %,
- toksiškumo etalono  $LD_{50}$  atitinka apibrėžtą intervalą.

**1.5. BANDYMO METODO APRAŠYMAS****1.5.1. Bičių rinkimas**

Turi būti naudojamos jaunos suaugusios bitės darbininkės, t. y. to paties amžiaus, vienodai maitinamos, tos pačios veislės ir t. t. Bitės turi būti gaunamos iš tinkamai maitinamų, sveikų, kiek įmanoma be ligų ir vienos motinėls kolonijų, kurių istorija ir fiziologinė būsena yra žinoma. Jos gali būti renkamos tą rytą, kai numatomos naudoti, ar vakare prieš bandymą ir laikomos bandymo sąlygomis iki kitos dienos. Tinka iš rėmų surinktos bitės be perų. Reikėtų vengti rinkti bites ankstyvą pavasarį ar vėlyvą rudenį, nes tokiu metu keičiasi bičių fiziologija. Jei bandymai turi būti atliekami anksti pavasarį ar vėlai rudenį, bitės gali būti užaugintos inkubatoriuje ir vieną savaitę maitinamos bičių duonele (nuo korio surinktomis žiedadulkėmis) ir sacharozės tirpalu. Bitės, apdorotos cheminėmis medžiagomis, pvz., antibiotikais, preparatais varazei gydyti ir t. t., toksiškumo bandymams neturėtų būti naudojamos, jei po apdorojimo paskutinį kartą dar nėra praėję keturių savaičių.

**1.5.2. Laikymo ir maitinimo sąlygos**

Naudojami lengvai plaunami ir gerai vėdinami narveliai. Galima naudoti bet kurios tinkamos medžiagos, pvz., nerūdijančio plieno, vielos tinklelio, plastiko, vienkartinius medinius narvelius ir t. t. Narvelių dydis turi atitikti bičių skaičių, t. y. joms reikia palikti pakankamai vietos. Geriau naudoti dešimties bičių vienam narveliui grupes.

Bitės bandymo patalpoje turi būti laikomos tamsoje esant  $25 \pm 2$  °C temperatūrai. Santykinis drėgnumas, paprastai apie 50–70 %, turi būti registruojamas per visą bandymą. Bičių tvarkymo procedūras, įskaitant apdorojimą ir stebėjimus, galima daryti (dienos) šviesoje. Maistą sudaro sacharozės vandeninis tirpalas, kurio galutinė koncentracija yra 500 g/l (50 % w/v), duodamas pasirinktinu laiku per visą bandymą naudojant bičių maitinimo įtaisą. Tai gali būti stiklinis mėgintuvėlis (maždaug 50 mm ilgio ir 10 mm pločio, kurio atviras galas susiaurinamas maždaug iki 2 mm skersmens)

**1.5.3. Bičių ruošimas**

Surinktos bitės gali būti apmarintos anglies dioksidu ar azotu, kad būtų galima uždėti bandomąją medžiagą. Anestezuojančios medžiagos kiekis ir veikimo trukmė turi būti kiek įmanoma mažesni. Prieš pradėdant bandymą mirstančios bitės turi būti pašalintos ir pakeistos sveikomis.

**1.5.4. Dozių ruošimas**

Bandomoji medžiaga turi būti užlašinama tirpalo nešiklyje pavidalu, t. y. ištirpinta organiniame tirpiklyje ar vandenyje, turinčiame drėkiklio. Kaip organinį tirpiklį geriau būtų naudoti acetoną, tačiau galima naudoti kitus mažai toksiškus bitėms tirpiklius (pvz., dimetilformamidą, dimetilsulfoksidą). Jei tai vandenyje disperguoti cheminiai preparatai ir organiniuose tirpikliuose netirpios labai polinės organinės medžiagos, būtų lengviau užlašinti nedidelės koncentracijos komerciniame drėkiklyje (pvz., *Agral*, *Cittowett*, *Lubrol*, *Triton*, *Tween*) paruoštus tirpalus.

Turi būti paruošti atitinkami kontroliniai tirpalai, t. y. jei bandomajai medžiagai tirpinti naudojamas tirpiklis ar dispergatorius, turi būti naudojamos dvi atskiros kontrolinių bandinių grupės: vienos grupės bitės apdorojamos vandeniu, kitos grupės bitės tirpikliu/nešikliu.

**1.6. BANDYMO PROCEDŪRA****1.6.1. Bandymų ir kontrolinės grupės**

Dozių ir lygiagrečių bandinių skaičius turi atitikti statistinius LD<sub>50</sub> nustatymo reikalavimus esant 95 % pasiklovimo riboms. Paprastai bandymui reikia penkių LD<sub>50</sub> intervalo dozių, išdėstytų geometrine progresija, kurios koeficientas būtų ne didesnis kaip 2,2. Tačiau skiedimo faktorius ir dozavimui naudojamų koncentracijų skaičius turi būti nustatyti pagal toksiškumo kreivės (mirštamumas kaip dozės funkcija) krypties koeficientą ir atsižvelgiant į rezultatus analizuoti pasirinktą statistinį metodą. Dozavimui tinkamas koncentracijas galima pasirinkti pagal intervalo nustatymo bandymo rezultatus.

Kiekvienai bandymo koncentracijai dozė 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 bandomųjų seriją turi būti įtrauktas toksiškumo etalonas. Laukiamai  $LD_{50}$  dozei apimti turi būti pasirenkamos bent trys dozės. Kiekvienai bandomajai dozei turi būti bent trys narveliai su 10 bičių kiekviename narvelyje. Kaip toksiškumo etaloną geriau naudoti dimetoatą, kuriam literatūroje nurodytas kontaktinės  $LD_{50}$  24 h vertės intervalas yra 0,10–0,30 µg veikliosios medžiagos vienai bitei (2). Tačiau būtų priimtini ir kiti toksiškumo etalonai, jei būtų pateikta pakankamai duomenų laukiamam atsakui į dozės poveikį patikrinti (pvz., parationas).

**1.6.3. Veikimas****1.6.3.1. Dozių davimas**

Aparintos bitės apdorojamos atskirai darant vietinį užlašinimą. Bitės skirtingoms bandomosioms dozėms ir kontroliniams bandiniams paskirstomos atsitiktinai. Ant kiekvienos bitės krūtinės dorsalinės pusės mikropipete užlašinamas 1 µl tinkamos koncentracijos bandomosios medžiagos tirpalo. Galima naudoti kitokius tūrius, jei tai bus pagrįsta. Po užlašinimo bitės paskirstomos po narvelius ir joms duodama sacharozės tirpalo.

**1.6.3.2. Trukmė**

Geriausia bandymo trukmė yra 48 h. Jei mirštamumas 24–48 h laikotarpiu didėja daugiau kaip 10 %, bandymo trukmė turi būti prailginta ne daugiau kaip iki 96 h, jei mirštamumas kontroliniuose bandiniuose yra ne didesnis kaip 10 %.

**1.6.4. Stebėjimai**

Mirštamumas registruojamas po 4 h nuo dozės davimo, o vėliau po 24 h ir 48 h. Jei reikalingas prailgintas stebėjimo laikotarpis, tolesni vertinimai turi būti daromi kas 24 h ne ilgiau kaip iki 96 h, jei mirštamumas kontroliniuose bandiniuose yra ne didesnis kaip 10 %.

Turėtų būti registruojami visi bandymo metu pastebėti neįprasto elgesio reiškiniai

**1.6.5. Ribinis bandymas**

Kartais (pvz., kai manoma, kad bandomosios medžiagos toksiškumas turėtų būti mažas) galima atlikti ribinį bandymą naudojant 100 µg veikliosios medžiagos vienai bitei, taip norint parodyti, kad  $LD_{50}$  yra didesnė už šią vertę. Turėtų būti naudojama ta pati metodika, įskaitant tris lygiagrečias bandomųjų grupes bandomajai dozei, atitinkamus kontrolinius bandinius ir toksiškumo etaloną. Jei pasitaiko mirštamumo atvejų, turi būti daromas visas tyrimas. Jei pastebimas subletalus poveikis (žr. 1.6.4 skirsnį), jis turi būti užregistruotas.

**2. DUOMENYS IR ATASKAITA****2.1. DUOMENYS**

Duomenys turi būti apibendrinti lentelių pavidalu, kiekvienos dozės grupei, taip pat kontrolinių bandinių ir toksiškumo etalono grupėms nurodant naudotų bičių skaičių, mirštamumą kiekvienu stebėjimo momentu ir neįprastai besielgiančių bičių skaičių. Mirštamumo duomenis analizuokite atitinkamais analizės metodais (pvz., probito funkcijos analizė, slenkamasis vidurkis, binominio skirstinio tikimybė) (3) (4). Nubraižykite atsako, kaip dozės funkcijos, kreives kiekvienam rekomenduotam stebėjimo momentui (t. y. 24 h, 48 h ir, jei tinka, 72 h, 96 h) ir apskaičiuokite kreivių krypties koeficientus ir vidutines mirtinas dozes ( $LD_{50}$ ) su 95 % pasiklovimo ribomis. Galima padaryti pataisą dėl mirštamumo kontroliniuose bandiniuose naudojant Abbotto pataisą (4) (5).  $LD_{50}$  turi būti išreikšta µg bandomosios medžiagos vienai bitei.

**2.2. BANDYMO ATASKAITA**

Bandymo ataskaitoje turi būti tokia informacija:

**2.2.1. Bandomoji medžiaga:**

- fizikinė būsena ir atitinkamos fizikinės ir cheminės savybės (pvz., stabilumas vandenyje, garų slėgis),
- cheminio identifikavimo duomenys, įskaitant struktūrinę formulę, grynumą (t. y. pesticidams – identiškas ir veikliosios (-ųjų) medžiagos (-ų) koncentracija).



- 2.2.2. **Bandomieji gyvūnai:**
- mokslinis pavadinimas, veislė, apytikris amžius (savaitėmis), rinkimo būdas, rinkimo data,
  - informacija apie bandymų bičių rinkimui naudotas kolonijas, įskaitant sveikatą, visas suaugusių bičių ligas, prieš tai taikytą apdorojimą ir t. t.
- 2.2.3. **Bandymo sąlygos:**
- bandymo patalpos temperatūra ir santykinis drėgnis,
  - laikymo sąlygos, įskaitant narvelių tipą, dydį ir medžiagą,
  - bandomosios medžiagos davimo būdai, pvz., naudojamas tirpiklis, užlašinamo bandomojo tirpalo tūris, naudotos anestezuojančios medžiagos,
  - bandymo schemą, pvz., naudotos bandomosios dozės ir jų skaičius, kontrolinių bandinių skaičius; kiekvienai bandomajai koncentracijai ir kontroliniam bandiniui naudotų narvelių skaičius ir bičių skaičius viename narvelyje,
  - bandymo data.
- 2.2.4. **Rezultatai:**
- parengtinio intervalo nustatymo tyrimo, jei darytas, rezultatai,
  - neapdoroti duomenys: mirštamumas po kiekvienos bandytos dozės ir kiekvienu stebėjimo momentu,
  - dozės ir atsako kreivių brėžinys bandymo pabaigoje,
  - bandomosios medžiagos ir toksiškumo etalono LD<sub>50</sub> vertės su 95 % pasiklivimo ribomis, nustatytos kiekvienu rekomenduotu stebėjimo momentu,
  - LD<sub>50</sub> nustatymui taikyti statistiniai metodai,
  - mirštamumas kontroliniuose bandiniuose,
  - kitas pastebėtas ar išmatuotas biologinis poveikis ir bet koks bičių neįprastas elgesys,
  - visi nukrypimai nuo čia aprašytų bandymo metodikų ir visa kita susijusi informacija.
3. **NUORODOS**
- 1) EPPO/Council of Europe (1993). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Products – Honeybees. EPPO bulletin, vol. 23, N.1, 151–165. March, 1993.
  - 2) Gough, H. J., McIndoe, E.C., Lewis, G.B. (1994). The use of dimethoate as a reference compound in laboratory acute toxicity tests on honeybees (*Apis mellifera* L.), 1981–1992. Journal of Apicultural Research 22 119–125.
  - 3) Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. 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.

## C.18. ADSORBCIJA/DESORBCIJA TAIKANT STATINĖS PUSIAUSVYROS BANDYMĄ

## 1. METODAS

Šis metodas yra OECD (*Organization for Economic Cooperation and Development* – Ekonominio bendradarbiavimo ir plėtros organizacijos) TG (*Test Guidelines* – Bandymų gairės) 106 dėl dirvožemio adsorbcijos/desorbcijos taikant statinės pusiausvyros metodą kopija (2000).

## 1.1. ĮVADAS

Metode atsižvelgiama į tarplaboratorinio lyginimo bandymą ir į seminaro apie dirvožemio atranką tobulinant adsorbcijos metodą medžiagą (1) (2) (3) (4), taip pat į nacionaliniu lygiu taikomas rekomendacijas (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11).

Adsorbcijos/desorbcijos tyrimai yra naudingi kuriant svarbią informaciją apie cheminių medžiagų judrumą ir jų pasiskirstymą biosferos dirvožemio, vandens ir oro dalyse (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21). Informacija gali būti naudojama prognozuojant ar įvertinant, pvz., cheminės medžiagos skaidymą (22) (23), kitimą ir organizmų išsavinamą kiekį (24); jos išplovimą per dirvos sluoksnius (16) (18) (19) (21) (25) (26) (27) (28); lakumą nuo dirvožemio (21) (29) (30); nuotėkį nuo žemės paviršiaus į gamtinius vandenis (18) (31) (32). Adsorbcijos duomenys gali būti naudojami palyginimo ir modeliavimo tikslais (19) (33) (34) (35).

Cheminės medžiagos pasiskirstymas tarp dirvožemio ir vandeninių fazių yra sudėtingas procesas, kuris priklauso nuo daugelio skirtingų veiksnių: medžiagos cheminės prigimties (12) (36) (37) (38) (39) (40), dirvožemio charakteristikų (4) (12) (13) (14) (41) (42) (43) (44) (45) (46) (47) (48) (49) ir klimato veiksnių, pvz., lietaus, temperatūros, saulės šviesos ir vėjo. Čia pateiktas metodas yra supaprastintas laboratorinis modelis, kuris negali iki galo išaiškinti cheminės medžiagos adsorbcijos dirvožemiu reiškinį 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 susidaranciu koloidinių dalelių (skersmuo < 0,2 μm).

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 katjonų mainų geba (ECEC), amorfinių geležies ir aliuminio oksidų kiekis, ypač vulkaninės kilmės ir tropikų dirvožemiui (4), taip pat savitasis paviršius (49).

Bandymas skirtas cheminės medžiagos adsorbcijai ant skirtingų dirvožemio tipų su kintamu organinės anglies kiekiu, molio kiekiu ir dirvožemio struktūra bei pH įvertinti. Jį sudaro trys tarpiniai:

**1 tarpnis.** Pradinis tyrimas norint nustatyti:

- dirvožemio/tirpalo santykį,
- adsorbcijos pusiausvyros nusistovėjimo trukmę ir pusiausvyros sąlygomis adsorbuotos medžiagos kiekį,
- medžiagos adsorbciją ant bandymo indų paviršių ir bandomosios medžiagos stabilumą bandymo laikotarpiu.

**2 tarpsnis.** Atrankos bandymas: tirama penkių skirtingų tipų dirvožemio adsorbicijos kinetiką vienai koncentracijai ir nustatant pasiskirstymo koeficientus  $K_d$  ir  $K_{oc}$ .

**3 tarpsnis.** Freundlichio adsorbicijos izotermių apskaičiavimas norint nustatyti koncentracijos įtaką adsorbicijos dirvožemiu laipsniui.

Desorbicijos tyrimas taikant desorbicijos kinetiką/Freundlichio desorbicijos izotermes (1 priedėlis).

## 1.3.

## APIBRĖŽTYS IR VIENETAI

Simbolis	Apribrėžtis	Vienetai
$(A_{t_i})$	adsorbicijos procentinė dalis laiku $t_i$	%
$A_{eq}$	adsorbicijos procentinė dalis adsorbicijos pusiausvyros sąlygomis	%
$(m_s^{ads}(t_i))$	bandomosios medžiagos, adsorbuotos dirvožemiu laiku $\Delta t_i$ , masė	$\mu\text{g}$
$(m_s^{ads}(\Delta t_i))$	bandomosios medžiagos, adsorbuotos dirvožemiu per laiką $\Delta t_i$ , masė	$\mu\text{g}$
$(m_s^{ads}(eq))$	bandomosios medžiagos, adsorbuotos dirvožemiu adsorbicijos pusiausvyros sąlygomis, masė	$\mu\text{g}$
$m_0$	adsorbicijos bandymo pradžioje mėgintuvėlyje esančios bandomosios medžiagos masė	$\mu\text{g}$
$(m_m^{ads}(t_i))$	bandomosios medžiagos masė, nustatyta tirpalo alikvotinėje dalyje ( $v_a^A$ ) laiku $t_i$	$\mu\text{g}$
$(m_{aq}^{ads}(eq))$	medžiagos tirpale masė adsorbicijos pusiausvyros sąlygomis	$\mu\text{g}$
$m_{soil}$	dirvožemio fazės kiekis, išreikštas sauso dirvožemio mase	g
$C_{st}$	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 atliekama analizė	$\mu\text{g cm}^{-3}$
$(C_s^{ads}(eq))$	dirvožemiu adsorbuotos medžiagos kiekis adsorbicijos pusiausvyros sąlygomis	$\mu\text{g g}^{-1}$
$(C_{aq}^{ads}(eq))$	medžiagos vandeninės fazės masės koncentracija adsorbicijos pusiausvyros sąlygomis	$\mu\text{g cm}^{-3}$
$V_o$	sąlytyje su dirvožemiu esančios vandeninės fazės pradinis tūris atliekant adsorbicijos bandymą	$\text{cm}^3$
$(v_a^A)$	aliquotinės tirpalo dalies tūris, kuriame matuojama bandomoji medžiaga	$\text{cm}^3$
$K_d$	adsorbicijos pasiskirstymo koeficientas	$\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$
$K_{oc}$	pagal organinę anglį normalizuotas adsorbicijos 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 adsorbicijos koeficientas	$\mu\text{g}^{-1-1/n} (\text{cm}^3)^{1/n} \text{g}$
$1/n$	Freundlichio lygties laipsnio rodiklis	
$(D_{t_i})$	desorbicijos procentinė dalis laiku $t_i$	%
$(D_{\Delta t_i})$	desorbicijos procentinė dalis, atitinkanti laiko intervalą $\Delta t_i$	%
$K_{des}$	tiriamasis desorbicijos koeficientas	$\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$
$(K_F^{des})$	Freundlichio desorbicijos koeficientas	$\mu\text{g}^{1-1/n} (\text{cm}^3)^{1/n} \text{g}$
$(m_{aq}^{des}(t_i))$	bandomosios medžiagos, desorbuotos nuo dirvožemio laiku $t_i$ masė	$\mu\text{g}$
$(m_m^{des}(\Delta t_i))$	bandomosios medžiagos, desorbuotos nuo dirvožemio per laiką $\Delta t_i$ , masė	$\mu\text{g}$
$(m_m^{des}(eq))$	medžiagos masė, analiziškai nustatyta vandeninėje fazėje desorbicijos pusiausvyros sąlygomis	$\mu\text{g}$
$(m_{aq}^{des}(eq))$	bandomosios medžiagos, desorbuotos desorbicijos pusiausvyros sąlygomis, bendroji masė	$\mu\text{g}$

Simbolis	Apibrėžtis	Vienetai
$(m_s^{des}(\Delta t_i))$	medžiagos, kuri liko adsorbuota dirvožemiui praėjus laiko tarpui $\Delta t_i$ , masė	$\mu\text{g}$
$(m_{aq}^A)$	medžiagos, likusios po adsorbcijos pusiausvyros bandymo dėl nevisiško tūrio pakeitimo, masė	$\mu\text{g}$
$(C_s^{des}(eq))$	bandomosios medžiagos, kuri liko adsorbuota dirvožemiui desorbcijos pusiausvyros sąlygomis, kiekis	$\mu\text{g g}^{-1}$
$(C_{aq}^{des}(eq))$	bandomosios medžiagos vandeninės fazės masės koncentracija desorbcijos pusiausvyros sąlygomis	$\mu\text{g cm}^{-3}$
$V_T$	vandeninės fazės, esančios sąlytyje su dirvožemiui atliekant desorbcijos kinetikos bandymą nuosekliu metodu, bendras tūris	$\text{cm}^3$
$V_R$	tirpalo virš nuosėdų, pašalinto iš mėgintuvėlio pasiekus adsorbcijos pusiausvyrą ir pakeisto tokiu pat tūriu 0,01 M $\text{CaCl}_2$ tirpalo, tūris	$\text{cm}^3$
$(V_a^D)$	tirpalo, paimto iš mėgintuvėlio (i) bandomosios medžiagos kiekiui nustatyti atliekant desorbcijos kinetikos bandymą nuosekliu metodu, alikvotinės dalies tūris	$\text{cm}^3$
$(V_r^r)$	tirpalo, paimto iš mėgintuvėlio (i) bandomosios medžiagos kiekiui nustatyti atliekant desorbcijos kinetikos bandymą (lygiagretusis metodas), tūris	$\text{cm}^3$
$(V_r^f)$	tirpalo, paimto iš mėgintuvėlio bandomosios medžiagos kiekiui nustatyti desorbcijos pusiausvyros sąlygomis, tūris	$\text{cm}^3$
MB	masių balansas	%
$m_E$	bandomosios medžiagos, dviem pakopomis ekstrahuotos iš dirvožemio ir nuo sienelių, bendroji masė	$\mu\text{g}$
$V_{rec}$	adsorbcijos pusiausvyros sąlygomis regeneruoto tirpalo virš nuosėdų tūris	$\text{cm}^3$
$P_{ow}$	pasiskirstymo koeficientas (n-oktanolis/vanduo)	
pKa	disociacijos konstanta	
$S_w$	tirpumas vandenyje	$\text{g l}^{-1}$

#### 1.4. BANDYMO METODO PRINCIPAS

Žinomi bandomosios medžiagos, neturinčios ar turinčios žymėtųjų atomų, tirpalo 0,01 M  $\text{CaCl}_2$  tūriai yra sumaišomi su žinomos sauso dirvožemio masės bandiniais, prieš tai laikytais pusiausvyrai nusistovėti 0,01 M  $\text{CaCl}_2$ . Mišinys tam tikrą laiką maišomas. Paskui dirvožemio suspensija atskiriama centrifugavimu ir, jei to pageidaujama, filtravimu, o vandeninė fazė analizuojama. Dirvožemio bandiniu adsorbuotos bandomosios medžiagos kiekis apskaičiuojamas kaip skirtumas tarp pradinio bandomosios medžiagos kiekio tirpale ir jos kiekio bandymo pabaigoje (netiesioginis metodas).

Pagal kitą metodą atliekama dirvožemio analizė ir tiesiogiai nustatomas adsorbuotos bandomosios medžiagos kiekis (tiesioginis metodas). Šis metodas, kurį sudaro pakopinis dirvožemio ekstrahavimas atitinkamu tirpikliu, rekomenduojamas tais atvejais, kai negalima tiksliai nustatyti bandomosios medžiagos tirpalo koncentracijos skirtumo. Tokių atvejų pavyzdžiai yra: bandomosios medžiagos adsorbcija ant bandymo indų paviršiaus; bandomosios medžiagos nestabilumas bandymo metu; silpna adsorbcija, todėl tirpalo koncentracijos pokytis yra labai mažas; stipri adsorbcija, todėl tirpalo koncentracija labai sumažėja ir negali būti tiksliai nustatyta. Naudojant medžiagą su žymėtaisiais atomais, dirvožemio galima ir neekstrahuoti, jei dirvožemio fazės analizei taikomas sudėginimo 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.

#### 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 pusėjimo trukmė yra trumpa, turi būti taikomos skilimo pataisos.

Prieš atliekant adsorbcijos/desorbcijos bandymą apie bandomąją medžiagą turi būti žinoma ši informacija:

- a) tirpumas vandenyje (A.6);
- b) garų slėgis (A.4) ir (ar) Henry'o dėsnio konstanta;
- c) abiotinis skaidymas: hidrolizė kaip pH funkcija (C.7);
- d) pasiskirstymo koeficientas (A.8);
- e) lengvas biologinis skaidymas (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 išėiga) ir fotocheminis skaidymas ant dirvožemio.

#### 1.6. BANDYMO TAIKOMUMAS

Bandymas tinka cheminėms medžiagoms, kurioms yra nustatytas pakankamo tikslumo analizės metodas. Svarbus parametras, kuris gali turėti įtakos rezultatų patikimumui, ypač taikant netiesioginį metodą, yra bandomosios medžiagos stabilumas bandymo metu. Taigi stabilumą būtina tikrinti darant pradinį tyrimą; jei bandymo metu stebimas medžiagos kitimas, darant pagrindinį tyrimą rekomenduojama analizuoti dirvožemio ir vandeninę fazes.

Gali kilti sunkumų atliekant bandymą su bandomosiomis medžiagomis, kurių tirpumas vandenyje yra mažas ( $S_w < 10^{-4} \text{ g l}^{-1}$ ), taip pat esant dideliame bandomųjų medžiagų kiekiui, nes medžiagos koncentracija vandeninėje fazėje negali būti analiziškai nustatyta pakankamai tiksliai. Šiais atvejais būtina imtis papildomų priemonių. Nurodymai, kaip spręsti šias problemas, pateikti atitinkamuose šio metodo aprašymo skirsniuose.

Bandant lakiąsias medžiagas reikia imtis atsargumo priemonių nuostoliams bandymo metu išvengti.

#### 1.7. METODO APRAŠYMAS

##### 1.7.1. Aparatūra ir cheminiai reagentai

Reikalinga ši standartinė laboratorijos įranga:

- a) mėgintuvėliai ar indai bandymams atlikti. Svarbu, kad šie mėgintuvėliai ar indai:
  - būtų pritaikyti centrifugavimo aparatui, norint sumažinti tvarkymo ir pernešimo paklaidas,
  - būtų pagaminti iš inertinės medžiagos, kurios paviršiuje bandomosios medžiagos adsorbcija būtų kuo mažesnė;
- b) maišymo įtaisas: vertikalioji purtyklė ar lygiavertė įranga; maišant maišymo įtaisu dirvožemis turi sudaryti suspensiją;
- c) centrifuga: geriau didelio apsisukimų dažnio, pvz., centrifugavimo jėga  $> 3\,000 \text{ g}$ , su termostatu, iš vandeninio tirpalo galinti pašalinti daleles, kurių skersmuo didesnis kaip  $0,2 \mu\text{m}$ . 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 –  $0,2 \mu\text{m}$ , sterilūs, vienkartiniai. Ypatingą dėmesį reikia kreipti parenkant filtro medžiagą, kad būtų išvengta bet kokių bandomosios medžiagos nuostolių ant filtro; mažai tirpioms medžiagoms nerekomenduojama naudoti filtrų iš organinės medžiagos;
- e) analizės aparatūra, tinkama bandomosios cheminės medžiagos koncentracijai nustatyti;

f) laboratorinė krosnis, kurioje galima palaikyti 103–110 °C temperatūrą.

### 1.7.2. Dirvožemio tipo apibūdinimas ir parinkimas

Dirvožemio tipą turėtų apibūdinti trys parametrai, kurie laikomi darančiais didžiausią įtaką adsorbcijos gebai: organinė anglis, molio kiekis ir dirvožemio struktūra bei pH. Kaip minėta (žr. skirsnį „Taikymo sritis“), konkrečios medžiagos adsorbcijai/desorbcijai įtakos gali turėti kitos fizikinės ir cheminės dirvožemio savybės, ir tokiais atvejais į jas turi būti atsižvelgta.

Metodai, taikyti dirvožemiui apibūdinti, yra labai svarbūs ir daro didelę įtaką rezultatams. Taigi atitinkamu ISO metodu (ISO-10390–1) rekomenduojama išmatuoti dirvožemio 0,01 M CaCl<sub>2</sub> 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 dirvožemį adsorbcijos/desorbcijos bandymams, pateikti 1 lentelėje. Parinkti septyni dirvožemio tipai apima vidutinėse geografinėse zonose pasitaikančius dirvožemio tipus. Jei bandomosios medžiagos yra jonizuojamos, parinkti dirvožemio tipai turi apimti platų pH verčių intervalą, kad būtų galima įvertinti jonizuotos ir nejonizuotos medžiagos adsorbciją. Nurodymai, kiek skirtingų dirvožemio tipų naudoti įvairiose bandymo pakopose, pateikti 1.9 skirsnyje „Bandymo procedūra“.

Jei labiau tinka kitų tipų dirvožemis, jis turi būti apibūdinamas 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 intervalas (0,01 M CaCl <sub>2</sub> )	Organinės anglies kiekis (%)	Molio kiekis (%)	Dirvožemio struktūra <sup>(1)</sup>
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 <sup>(2)</sup>	< 0,5– 1,5 <sup>(2)</sup> <sup>(3)</sup>	< 10–15 <sup>(2)</sup>	rišlus smėlis
6	> 7,0	< 0,5– 1,0 <sup>(2)</sup> <sup>(3)</sup>	40–65	sunkus priemolis/molis
7	< 4,5	> 10	< 10	smėlis/rišlus smėlis

<sup>(1)</sup> Pagal FAO (*Food and Agricultural Organization* – Maisto ir žemės ūkio organizacija) ir JAV sistemą (85).

<sup>(2)</sup> Būtų geriau, jei atitinkamų kintamųjų vertės būtų nurodytame intervale. Tačiau, jei kyla sunkumų rasti tinkamą dirvožemį, priimtinos mažesnės nei nurodytos mažiausios vertės.

<sup>(3)</sup> Dirvožemis, kuriame organinės anglies yra mažiau kaip 0,3 %, gali sutrikdyti koreliaciją tarp organinės anglies kiekio ir adsorbcijos. Taigi rekomenduojama naudoti dirvožemį, kuriame organinės anglies būtų ne mažiau kaip 0,3 %.

### 1.7.3. Dirvožemio bandinių rinkimas ir laikymas

#### 1.7.3.1. Rinkimas

Specialių bandinių ėmimo metodų arba priemonių rekomenduoti negalima; bandinių ėmimo metodas priklauso nuo tyrimo tikslo (53) (54) (55) (56) (57) (58).

Reikia atsižvelgti į šiuos dalykus:

- a) būtina turėti išsamią informaciją apie lauko sklypo istoriją; informaciją sudaro vieta, augmenijos danga, apdorojimas pesticidais ir (ar) trąšomis, biologiniai priedai ar atsitiktinis užteršimas. Reikia laikytis dirvožemio bandinių ėmimo ISO standarto (ISO 10381–6) rekomendacijų atsižvelgiant į bandinio ėmimo vietos aprašymą;
- b) bandinių ėmimo vieta turi būti apibrėžta UTM (*Universal Transversal Mercator-Projection/European Horizontal Datum* – Universalioji skersinė Merkatoriaus projekcija/Europos horizontalus atskaitos lygis) ar geografinių koordinatų; 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.

#### 1.7.3.2. *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 gebai (CEC) nustatyti.

#### 1.7.3.3. *Dirvožemio bandinių apdorojimas ir paruošimas bandymui*

Dirvožemis džiovinamas ore kambario temperatūros sąlygomis (geriau 20–25 °C). Smulkinti reikia kuo mažesne jėga, kad pradinė dirvožemio sandara pasikeistų kuo mažiau. Dirvožemis sijojamas, kol lieka  $\leq 2$  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  $\text{CaCl}_2$  tirpale, kuriam ruošti naudojamas distiliuotas ar dejonizuotas vanduo; kaip vandeninis tirpiklis  $\text{CaCl}_2$  tirpalas yra naudojamas centrifugavimui palengvinti ir katijonų mainams kiek įmanoma sumažinti. Pradinio tirpalo koncentracija turi būti trimis dydžiais didesnė nei taikomo metodo aptikimo riba. Ši riba garantuoja tikslius matavimus taikant šį metodą; be to, pradinio tirpalo koncentracija turi būti mažesnė nei bandomosios medžiagos tirpumo vandenyje vertė.

Pradinį tirpalą geriau gaminti prieš pat maišymą su dirvožemio bandiniais, tirpalas turi būti uždengtas ir laikomas tamsoje esant 4 °C. Laikymo trukmė priklauso nuo bandomosios medžiagos stabilumo ir nuo tirpalo koncentracijos.

Atitinkama tirpinimo medžiaga gali būti reikalinga tik mažai tirpioms medžiagoms ( $S_w < 10-4$  g l<sup>-1</sup>), kai bandomąją medžiagą sunku ištirpinti. Ši tirpinimo medžiaga: a) turi maišytis su vandeniu, pvz., metanolis ar acetonitrilas; b) jo koncentracija neturi būti didesnė kaip 1 % bendrojo pradinio tirpalo tūrio ir turi būti mažesnė nei sąlytyje su dirvožemiu esančios bandomosios medžiagos koncentracija (geriau, jei mažesnė kaip 0,1 %); c) neturi būti veiklioji paviršiaus medžiaga arba dalyvauti solvolizės reakcijoje su bandomąja medžiaga. Duomenų ataskaitoje turi būti nurodytas ir pagrįstas tokios tirpinimo medžiagos naudojimas.

Kitas mažai tirpioms medžiagoms taikomas būdas yra pridėti bandomosios medžiagos į bandymo sistemą naudojant pagalbinį tirpiklį: bandomoji medžiaga ištirpinama organiniame tirpiklyje, alikvotinė šio tirpalo dalis pridedama į dirvožemio ir 0,01 M  $\text{CaCl}_2$  tirpalo distiliuotame ar dejonizuotame vandenyje sistemą. Organinio tirpiklio kiekis vandeninėje fazėje turi būti kuo mažesnis, paprastai ne didesnis kaip 0,1 %. Medžiagos pridėjimas naudojant tirpalą organiniame tirpiklyje gali pabloginti tūrio atkuriamumą. Taigi gali atsirasti papildoma paklaida, nes bandomosios medžiagos ir pagalbinio tirpiklio koncentracija visuose bandymuose gali būti nevienoda.



## 1.8. ADSORBCIJOS/DESORBCIJOS BANDYMO BŪTINOSIOS SĄLYGOS

1.8.1. **Analizės metodas**

Pagrindiniai parametrai, galintys turėti įtakos sorbcijos matavimams, yra tirpalui ir adsorbuotoms fazėms analizuoti taikomo analizės metodo tikslumas, bandomosios medžiagos stabilumas ir grynumas, sorbcijos pusiausvyros pasiekimas, tirpalo koncentracijos pokyčio dydis, dirvožemio/tirpalo santykis ir dirvožemio struktūros pokyčiai nusistovint pusiausvyrai (35) (59–62). Keletas pavyzdžių, susijusių su tikslumo problemomis, pateikta 2 priedėlyje.

Taikomo analizės metodo patikimumas turi būti patikrintas pagal koncentracijų intervalą, kuris greičiausiai bus taikomas atliekant bandymą. Bandytojas gali laisvai tobulinti atitinkamą metodą, turintį reikiamą tikslumą, preciziškumą, atkuriamumą, aptikimo ribas ir regeneravimo lygį. Toliau pateikti nurodymai, kaip tokį bandymą atlikti.

Atitinkamas 0,01 M CaCl<sub>2</sub> tirpalo tūris, pvz., 100 cm<sup>3</sup>, 4 h purtomas su tam tikra labai adsorbuojančio, t. y. turinčio didelį organinės anglies ir molio kiekį, dirvožemio mase, pvz., 20 g; ši masė ir tūris gali skirtis priklausomai nuo analizės poreikių, tačiau dirvožemio/tirpalo santykis 1:5 yra patogus pradžios taškas. Mišinys centrifuguojamas ir vandeninė fazė gali būti filtruojama. Į vandeninę fazę įpilamas tam tikras tūris bandomosios medžiagos pradinio tirpalo vardinei koncentracijai pasiekti koncentracijos intervale, kuris greičiausiai bus taikomas atliekant bandymą. Šis tūris turi sudaryti ne daugiau kaip 10 % galutinio vandeninės fazės tūrio, kad kuo mažiau pasikeistų pradinio pusiausvyros nusistovėjimo tirpalo savybės. Tirpalas analizuojamas.

Norint patikrinti analizės metodo artefaktus ir dėl dirvožemio atsiradusius matricos efektus, turi būti įtrauktas vienas tuščiasis bandinys, kurį sudaro sistema dirvožemis + CaCl<sub>2</sub> tirpalas (be bandomosios medžiagos).

Analizės metodus, kurie gali būti taikomi sorbcijai matuoti, sudaro dujų ir skysčių chromatografija (*Gas-Liquid Chromatography*, GLC), didelio efektyvumo skysčių chromatografija (*high-performance liquid chromatography*, UPLC), spektrometrija (pvz., GC/masių spektrometrija, HPLC/masių spektrometrija) ir skysčių scintiliacijos skaičiavimas (medžiagų su žymėtaisiais atomais). Nesvarbu, koks analizės metodas taikomas, tinkamu laikomas regeneravimo lygis, kuris sudaro 90–110 % vardinės vertės. Norint medžiagą aptikti ir įvertinti po įvykdyto atskyrimo, analizės metodo aptikimo riba turi būti bent dviem dydžio eilėmis mažesnė nei vardinė koncentracija.

Adsorbcijos tyrimams taikomo analizės metodo charakteristikos ir aptikimo riba yra labai svarbios apibrėžiant bandymo sąlygas ir gautus tyrimų rezultatus. Šis metodas nekeičia bendrosios bandymo procedūros ir numato alternatyvius sprendimus, jei galimybes riboja analizės metodas ir laboratorijos įranga.

1.8.2. **Optimalaus dirvožemio/tirpalo santykio parinkimas**

Tinkamo dirvožemio ir tirpalo santykio parinkimas sorbcijos tyrimams priklauso nuo pasiskirstymo koeficiento K<sub>d</sub> 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<sub>d</sub> vertės įverčiu darant išankstinius tyrimus arba taikant sukurtus vertinimo metodus (3 priedėlis). Tinkamą santykį galima pasirinkti pagal dirvožemio/tirpalo santykio ir K<sub>d</sub> grafiką nustatytai adsorbcijos procentinei daliai (1 pav.). Šiam grafikui nubrėžti daroma prielaida, kad adsorbcijos lygtis yra tiesiška (1). Tinkamas sąryšis gaunamas K<sub>d</sub> (4) lygtį pertvarkant į (1) lygtį:

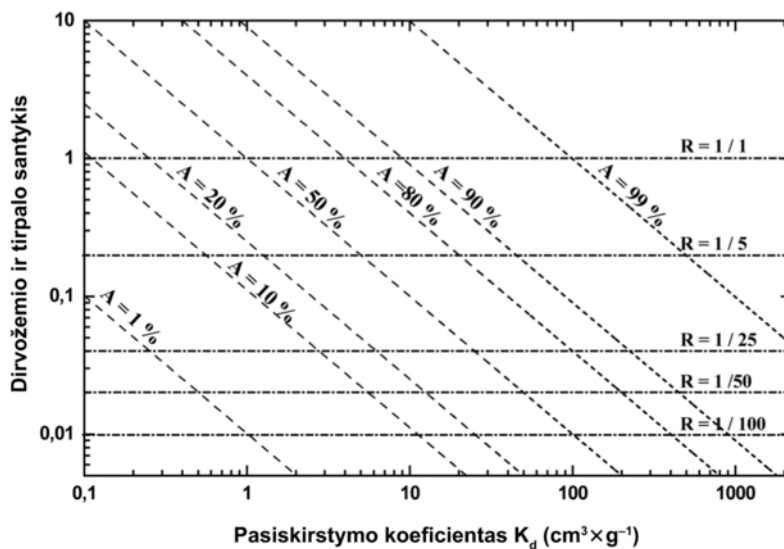
$$\left( \frac{V_0}{m_{\text{soil}}} \right) = \left( \left( \frac{m_0}{m_s^{\text{ads}}(\text{eq})} \right) - 1 \right) K_d \quad (1)$$

(1) Csadseq=K<sub>d</sub>·Caqadseq.



ar į jos logaritminę išraišką, darant prielaidą, kad  $R = m_{\text{soil}}/V_0$  and  $A_{\text{eq}}\%/100 = \left( \frac{(m_s^{\text{ads}}(\text{eq}))}{(m_0)} \right)$ :

$$\log R = -\log K_d + \log \left[ \frac{(A_{\text{eq}}\%/100)}{(1-A_{\text{eq}}\%/100)} \right] \quad (2)$$



1 pvz., Dirvožemio/tirpalo santykio ir  $K_d$  sąryšis esant įvairioms adsorbuotos medžiagos procentinėms dalims

1 pvz., reikiamas dirvožemio/tirpalo santykis pateiktas kaip  $K_d$  funkcija esant įvairiems adsorbcijos lygiams. Pvz., jei dirvožemio/tirpalo santykis yra 1:5 ir  $K_d$  20, adsorbcijos laipsnis maždaug 80 %. 50 % adsorbcijai gauti esant tam pačiam  $K_d$  turi būti taikomas santykis 1:25. Šis tinkamo dirvožemio/tirpalo santykio pasirinkimo būdas leidžia bandytojui lanksčiai prisitaikyti prie bandymo poreikių.

Sunkiau yra panaudoti tas sritis, kuriose medžiaga adsorbuojama labai stipriai arba labai silpnai. Jei adsorbcija vyksta silpnai, rekomenduojamas 1:1 dirvožemio/tirpalo santykis, nors kai kuriems dirvožemiams su dideliu organinės medžiagos kiekiu šį santykį būtina padidinti norint gauti suspensiją. Reikia pasirūpinti analizės metodu mažiems tirpalo koncentracijos pokyčiams matuoti; kitaip adsorbcijos matavimas bus netikslus. Kita vertus, esant labai dideliems pasiskirstymo koeficientams  $K_d$ , dirvožemio/tirpalo santykį galima mažinti iki 1:100, kad cheminės medžiagos tirpale liktų daug. Tačiau reikia stengtis gerai sumaišyti ir būtina duoti pakankamai laiko sistemai pasiekti pusiausvyrą. Alternatyvus šių ribinių atvejų naudojimo būdas, kai nėra tinkamo analizės metodo, yra  $K_d$  vertės prognozė taikant vertinimo metodikas, pagrįstas, pvz,  $P_{\text{ow}}$  vertėmis (3 priedėlis). Tai gali būti naudinga ypač silpnai adsorbuojamoms ar polinėms medžiagoms, kurių  $P_{\text{ow}} < 20$ , ir lipofilinėms ar stipriai sorbuojamoms cheminėms medžiagoms, kurių  $P_{\text{ow}} > 10^4$ .

## 1.9. BANDYMO PROCEDŪRA

### 1.9.1. Bandymo sąlygos

Visi bandymai atliekami aplinkos temperatūros ir, jei įmanoma, pastovios temperatūros nuo 20 °C iki 25 °C sąlygomis.

Centrifugavimo sąlygos turi būti tokios, kad būtų galima pašalinti iš tirpalo didesnes kaip 0,2 μm daleles. Ši vertė atitinka mažiausią dydį, iki kurio dalelė dar laikoma kietąja dalele, ir tai yra riba tarp kietųjų ir koloidinių dalelių. Kaip nustatyti centrifugavimo sąlygas, nurodyta 4 priedėlyje.

Jei negalima garantuoti, kad centrifugavimo priemonės pašalins didesnes kaip 0,2 μm daleles, būtų galima taikyti centrifugavimo ir filtravimo pro 0,2 μm filtrus derinį. Norint išvengti ant filtrų bet kokių bandomosios medžiagos nuostolių, indai turi būti pagaminti iš tinkamos inertinės medžiagos. Bet kuriuo atveju turi būti įrodyta, kad filtruojant nepatiriama jokių bandomosios medžiagos nuostolių.

**1.9.2. 1 tarpsnis. Pradinis tyrimas**

Pradinio tyrimo vykdymo tikslas jau buvo nurodytas skirsnyje „Taikymo sritis“. Toliau pateikiamos rekomendacijos, kaip atlikti tokį bandymą.

**1.9.2.1. Optimalaus dirvožemio/tirpalo santykio verčių parinkimas**

Naudojami du dirvožemio tipai ir trys dirvožemio/tirpalo santykio vertės (šeši bandymai). Vieno tipo dirvožemyje yra didelis organinės anglies ir mažas molio kiekis, kito tipo dirvožemyje – mažas organinės anglies ir didelis molio kiekis. Siūloma naudoti tokius dirvožemio ir tirpalo santykius:

- 50 g dirvožemio 50 cm<sup>3</sup> bandomosios medžiagos vandeninio tirpalo (santykis 1/1),
- 10 g dirvožemio ir 50 cm<sup>3</sup> bandomosios medžiagos vandeninio tirpalo (santykis 1/5),
- 2 g dirvožemio ir 50 cm<sup>3</sup> bandomosios medžiagos vandeninio tirpalo (santykis 1/25).

Mažiausias dirvožemio kiekis, su kuriuo gali būti atliekamas bandymas, priklauso nuo laboratorijos įrangos ir taikomų analizės metodų charakteristikų. Tačiau norint gauti patikimus bandymo rezultatus, rekomenduojama naudoti bent 1 g, o geriau 2 g dirvožemio.

Bandomosios medžiagos stabilumui CaCl<sub>2</sub> tirpale ir jos galimai adsorbcijai ant bandymo indų paviršių patikrinti vienas kontrolinis bandinys, kurį sudaro 0,01 M CaCl<sub>2</sub> tirpale ištirpinta bandomoji medžiaga (be dirvožemio), pereina tiksliai tas pačias pakopas kaip ir bandomosios sistemos.

Tuščiasis bandinys kiekvienam dirvožemiui su tuo pačiu dirvožemio kiekiu ir bendru 50 cm<sup>3</sup> 0,01 M CaCl<sub>2</sub> tirpalo tūriu (be bandomosios medžiagos) bandomas pagal tą pačią bandymo metodiką. Atliekant analizę šis bandinys yra fono kontrolės priemonė trukdančioms medžiagoms ar užterštiems dirvožemiams aptikti.

Visi bandymai, įskaitant kontrolinius ir tuščiuosius, turi būti atliekami bent po du kartus. Bendras tyrimui paruoštų bandinių skaičius gali būti apskaičiuotas atsižvelgiant į taikomą metodą.

Pradinio tyrimo ir pagrindinio tyrimo metodai paprastai yra tie patys, būtinos daryti išimties nurodomos.

Pusiausvyrai pasiekti ore išdžiovinti dirvožemio bandiniai sumaišomi su ne mažesnio kaip 45 cm<sup>3</sup> tūrio 0,01 M CaCl<sub>2</sub> tirpalu ir mišinys purtomas per naktį (12 h) prieš bandymo dieną. Po to galutiniam 50 cm<sup>3</sup> tūriui gauti įpilamas tam tikras tūris bandomosios medžiagos pradinio tirpalo. Šis įpilamo pradinio tirpalo tūris: a) neturi sudaryti daugiau kaip 10 % galutinio 50 cm<sup>3</sup> vandeninės fazės tūrio, kad kuo mažiau pasikeistų pradinei pusiausvyrai nusistovėti naudoto tirpalo savybės; b) būtų toks, kad sąlytyje su dirvožemiu esančio bandomosios medžiagos pradinio tirpalo koncentracija (C<sub>0</sub>) 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 pradine medžiagos koncentracija (C<sub>0</sub>), jei tai įmanoma, būtų ne didesnė kaip pusė tirpumo vertės.

Toliau pateikiamas pavyzdys, kaip apskaičiuoti pradinio tirpalo koncentraciją (C<sub>0</sub>). Tarkime, kad aptikimo riba yra 0,01 μg cm<sup>-3</sup> ir adsorbcijos laipsnis 90 %; taigi sąlytyje su dirvožemiu esančios bandomosios medžiagos pradinė koncentracija turi būti 1 μg cm<sup>-3</sup> (dviem dydžio eilėmis didesnė kaip aptikimo ribos vertė). Darant prielaidą, kad įpilamo pradinio tirpalo tūris yra didžiausias, koks buvo rekomenduotas, t. y. 5 cm<sup>3</sup> į 45 cm<sup>3</sup> 0,01 M CaCl<sub>2</sub> pusiausvyros nusistovėjimo tirpalo (pradinis tirpalas sudaro 10 % 50 cm<sup>3</sup> bendrojo vandeninės fazės tūrio), pradinio tirpalo koncentracija turi būti 10 μg cm<sup>-3</sup>; 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.

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 pradinio mišiniu. Jei po centrifugavimo taikomas filtravimas, laboratorijoje turi būti priemonių mažiems alikvotinių dalių tūriams filtruoti. Rekomenduojama bendrą alikvotinių dalių tūrį imti ne didesnį kaip 1 % bendrojo tirpalo tūrio, kad atliekant bandymą labai nepakistų dirvožemio/tirpalo santykis ir nesumažėtų adsorbuojamos medžiagos masė.

Pagal vardinę pradinę koncentraciją ir bandinio ėmimo momentui ( $t_i$ ) išmatuotą koncentraciją, pataisytą tuščiojo bandymo verte, kiekvienam laiko momentui ( $t_i$ ) apskaičiuojama adsorbcijos ( $A_{t_i}$ ) procentinė dalis. Braižomi ( $A_{t_i}$ ) kitimo laike grafikai (5 priedėlis, 1 pav.), kad būtų galima nustatyti, ar jau pasiekta pusiausvyros horizontalioji kreivės dalis <sup>(1)</sup> Bandomosios medžiagos vandeninės fazės koncentracijos kitimo laike grafikai taip pat gali būti panaudoti nustatant, ar pasiekta pusiausvyros horizontalioji kreivės dalis (žr. 5 priedėlis, 2 pav.). Taip pat apskaičiuojama  $K_d$  vertė pusiausvyros sąlygomis. Pagal šią  $K_d$  vertę 1 pvz., pasirenkamas tinkamas dirvožemio/tirpalo santykis, kad adsorbcijos procentinė dalis būtų didesnė kaip 20 %, o geriau, jei > 50 % (61). Visos taikomos lygtys ir grafikų sudarymo principai pateikti skirsnyje „Duomenys ir ataskaita“ ir 5 priedėlyje.

#### 1.9.2.2. Adsorbcijos pusiausvyros nusistovėjimo trukmės ir pusiausvyros sąlygomis adsorbuotos medžiagos kiekio nustatymas

Kaip jau sakyta, ( $A_{t_i}$ ) ar ( $C_{aq}^{ads}$ ) kitimo laike grafikai leidžia įvertinti, ar pasiekta adsorbcijos pusiausvyra ir koks yra pusiausvyros sąlygomis adsorbuotos bandomosios medžiagos kiekis. Tokių grafikų pavyzdžiai pateikti 5 priedėlio 1 ir 2 paveiksluose. Pusiausvyros nusistovėjimo trukmė – tai laikas, per kurį sistema pasiekia kreivės horizontaliąją dalį.

Jei 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 bandymo indų paviršiaus ir bandomosios medžiagos stabilumas

Tam tikros informacijos apie bandomosios medžiagos adsorbciją ant bandymo indų paviršiaus, taip pat apie jos stabilumą galima gauti analizuojant kontrolinius bandinius. Jei pastebimas medžiagos išsikvojimas yra didesnis nei analizės metodo standartinė paklaida, gali vykti abiotinis skaidymas ir (ar) adsorbcija ant bandymo indų paviršiaus. Šiuos du reiškinius galima atskirti, jei indų sienelės gerai nuplaunamos žinomu kiekiu atitinkamo tirpiklio ir plovimui naudotas tirpalas analizuojamas ieškant bandomosios medžiagos. Jei adsorbcija ant indų paviršiaus nevyksta, medžiagos išsikvojimas rodo abiotinį bandomosios medžiagos nestabilumą. Jei adsorbcija įrodoma, būtina keisti medžiagas, iš kurių pagaminti bandymo indai. Tačiau šiuo bandymu surinkti duomenys apie adsorbciją ant bandymo indų sienelių negali būti tiesiogiai ekstrapoliuoti dirvožemio/tirpalo bandymui. Šiai adsorbcijai įtakos gali turėti dirvožemis.

<sup>(1)</sup> 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.).

Papildomos informacijos apie bandomosios medžiagos stabilumą galima gauti nustatant pradinės medžiagos masės balansą per tam tikrą laiką. Tokiu atveju atliekama vandeninės fazės, dirvožemio ekstraktų ir bandymo indų sienelių analizė ieškant bandomosios medžiagos. Skirtumas tarp pridėtos bandomosios medžiagos masės ir bandomosios medžiagos vandeninėje fazėje, ekstraktuose ir ant bandymo indų sienelių masių sumos yra lygus masei medžiagos, kuri buvo suardyta ir (ar) išgaravo, ir (ar) nebuvo ekstrahuota. Norint nustatyti masių balansą, atliekant bandymą turi būti pasiekta adsorbcijos pusiausvyra.

Masių balansas daromas dviem dirvožemiams ir kiekvieno dirvožemio vienam dirvožemio/tirpalo santykiui, kuriam pusiausvyros sąlygomis gaunamas didesnis kaip 20 %, o geriau > 50 % išieškojimas. Baigus santykio nustatymo bandymą, kai po 48 h atliekama paskutinė vandeninės fazės bandinio analizė, fazės yra atskiriamos centrifugavimu ir, jei pageidaujama, filtravimu. Vandeninė fazė regeneruojama kuo didesniu laipsniu, paskui bandomajai medžiagai iš dirvožemio ekstrahuoti į ją įpilama tinkamo ekstrahavimo tirpiklio (ekstrahavimo faktorius bent 95 %). Rekomenduojama nuosekliai ekstrahuoti bent du kartus. Nustatomas medžiagos kiekis dirvožemio ir bandymo indų ekstraktuose ir apskaičiuojamas masių balansas (10 lygtis, „Duomenys ir ataskaita“). Jei jis yra mažesnis kaip 90 %, laikoma, kad bandomoji medžiaga bandymo metu yra nestabili. Tačiau tyrimus galima tęsti toliau, atsižvelgiant į bandomosios medžiagos nestabilitumą; šiuo atveju rekomenduojama darant pagrindinį tyrimą analizuoti abi fazes.

### 1.9.3. 2 tarpnis. 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 tarpnio bandymų atlikti nereikia.

Pusiausvyros nusistovėjimo trukmė, dirvožemio/tirpalo santykis, dirvožemio bandinio masė, sąlytyje su dirvožemiu esančios vandeninės fazės tūris ir bandomosios medžiagos tirpalo koncentracija pasirenkami pagal pradinio tyrimo rezultatus. Analizę būtų geriau atlikti maždaug po 2, 4, 6, 8 (galbūt dar po 10 h) ir po 24 h sąlyčio; maišymo trukmė gali būti padidinta ne daugiau kaip iki 48 h, jei cheminei medžiagai pagal santykio nustatymo rezultatus reikalinga didesnė pusiausvyros nusistovėjimo trukmė. Tačiau analizės laiką reikėtų rinktis lanksčiai.

Kiekvienas bandymas (vienas dirvožemis ir vienas tirpalas) atliekamas bent du kartus, kad būtų galima įvertinti rezultatų sklaidą. Atliekant kiekvieną bandymą imamas tuščiasis bandinys. Jį sudaro dirvožemis ir 0,01 M  $\text{CaCl}_2$  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  $\text{CaCl}_2$  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 sorbcinę elgseną (35) (78) ir yra cheminių medžiagų būdingo judrumo dirvožemyje išraiška. Pvz., paprastai cheminės medžiagos, kurių  $K_d \leq 1 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ , kokybiškai laikomos judriomis. Panašiai MacCall *et al.* (16) buvo sukurta judrumo klasifikavimo schema, pagrįsta  $K_{oc}$  vertėmis. Be to, yra išplovimo klasifikavimo schemas, pagrįstos  $K_{oc}$  ir DT-50 (1) santykiu (32) (79).

Pagal paklaidų analizės tyrimus (61) mažesnės kaip  $0,3 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$   $K_d$  vertės negali būti tiksliai įvertintos pagal vandeninės fazės koncentracijos mažėjimą, netgi taikant palankiausią (tikslumo požiūriu) dirvožemio/tirpalo santykį, t. y. 1:1. Šiuo atveju rekomenduojama analizuoti abi fazes, dirvožemį ir tirpalą.

Atsižvelgiant į šias pastabas, rekomenduojama tęsti adsorbcinį cheminės medžiagos dirvoje elgsenos ir jos potencialaus judrumo tyrimą nustatant Freundlichio adsorbcijos izotermes toms sistemoms, kurioms pagal šio metodo aprašymą galima tiksliai nustatyti  $K_d$  vertes. Tiksliai nustatyti galima, jei  $K_d$  ir dirvožemio/tirpalo santykio sandaugos vertė yra > 0,3 matuojant vandeninės fazės koncentracijos mažėjimą (netiesioginis metodas) ar > 0,1, kai analizuojamos abi fazės (tiesioginis metodas) (61).

(1) DT-50: laikas, per kurį suskaidoma 50 % bandomosios medžiagos.

## 1.9.4. 3 tarpsnis. Adsorbcijos izotermės ir desorbcijos kinetika/desorbcijos izotermės

## 1.9.4.1. Adsorbcijos izotermės

Taikomos penkio<sup>2</sup>s bandomosios medžiagos koncentracijos, ir būtų gerai, jei jų vertė apimtų dvi dydžio eiles; pasirenkant šias koncentracijas reikia atsižvelgti į tirpumą vandenyje ir gaunamą vandeninės fazės pusiausvyros koncentraciją. Tas pats dirvožemio/tirpalo santykis turi būti taikomas per visą tyrimą. Adsorbcijos bandymas atliekamas taip, kaip aprašyta pirmiau, skirtumas tik toks, kad vandeninė fazė analizuojama vieną kartą pusiausvyros nusistovėjimo momentu, nustatytu pagal 2 tarpsnio rezultatus. Nustatoma tirpalų pusiausvyros koncentracija ir pagal medžiagos kiekio tirpale sumažėjimą arba tiesioginiu metodu apskaičiuojamas adsorbuotos medžiagos kiekis. Adsorbuotos medžiagos masė, tenkanti dirvožemio masės vienetui, grafiškai pateikiama kaip bandomosios medžiagos pusiausvyros koncentracijos funkcija (žr. „Duomenys ir ataskaita“).

Bandymo adsorbcijos izotermei gauti rezultatai

Iš ligi šiol pasiūlytų matematinių adsorbcijos modelių dažniausiai adsorbcijos procesams apibūdinti taikoma Freundlich'o izotermė. Smulkesnė informacija aiškinant adsorbcijos modelius ir jų svarbą pateikta nuorodose (41) (45) (80) (81) (82).

*Pastaba.* Reikėtų paminėti, kad skirtingų medžiagų  $K_F$  (Freundlich'o adsorbcijos koeficiento) vertes galima lyginti, jei šios  $K_F$  vertės yra išreikštos tais pačiais vienetais (83).

## 1.9.4.2. Desorbcijos kinetika

Šio bandymo tikslas yra ištirti, ar cheminę medžiagą dirvožemis adsorbuoja grįžtamai ar negrįžtamai. Ši informacija yra svarbi, kadangi, cheminei medžiagai esant lauko dirvožemyje, desorbcijos procesas taip pat vaidina svarbų vaidmenį. Be to, desorbcijos duomenys yra naudingi kaip įvesties duomenys kompiuteriu modeliuojant išplovimą ir ištirpusių medžiagų nuotėkį. Jei norima vykdyti desorbcijos tyrimą, rekomenduojama, kad kiekvienai sistemai, kuriai ankstesniame adsorbcijos kinetikos bandyme buvo galima tiksliai nustatyti  $K_d$ , būtų daromas toliau aprašytas tyrimas.

Panašiai kaip darant adsorbcijos kinetikos tyrimą, yra du desorbcijos kinetikos bandymo metodai: a) lygiagretusis metodas ir b) nuoseklusis metodas. Pasirinkti metodą leidžiama bandytojui, kuris turi atsižvelgti į laboratorijos įrangą ir lėšas.

- a) Lygiagretusis metodas: kiekvienam desorbcijai tirti pasirinktam dirvožemio tipui paruošiami bandiniai, kurių dirvožemio/tirpalo santykis būtų vienodas ir kurių būtų tiek, kiek laiko tarpų pasirinkta desorbcijos kinetikai tirti. Geriau naudoti laiko tarpus, pasirinktus adsorbcijos kinetikai tirti; tačiau bendras laikas gali būti atitinkamai padidintas, kad sistema galėtų pasiekti desorbcijos pusiausvyrą. Atliekant kiekvieną bandymą (vienas dirvožemis, vienas tirpalas) imamas vienas tuščiasis bandinys. Jį sudaro dirvožemis ir 0,01 M  $\text{CaCl}_2$  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  $\text{CaCl}_2$  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 tokiu pat tūriu 0,01 M  $\text{CaCl}_2$  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 tokiu pat tūriu 0,01 M  $\text{CaCl}_2$  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 tęšiamas 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  $\text{CaCl}_2$  tirpalo ir purtoma iki kito laiko tarpo.

Apskaičiuojama desorbcijos procentinė dalis kiekvienam laiko momentui  $(D_{t_i})$  ir (ar) laiko tarpui  $(D_{\Delta t_i})$  (pagal tyrimo poreikius) ir braižomas kitimo laike grafikas. Taip pat apskaičiuojamas desorbcijos koeficientas  $K_{des}$  pusiausvyros sąlygomis. Visos taikomos lygtys pateiktos skirsnyje „Duomenys ir ataskaita“ ir 5 priedėlyje.

Desorbcijos kinetikos bandymo rezultatai

Bendri desorbcijos procentinės dalies  $(D_{t_i})$  ir adsorbcijos  $(A_{t_i})$  kitimo laike grafikai leidžia įvertinti adsorbcijos proceso grįžtamumą. Adsorbcija laikoma grįžtama, jei laikas desorbcijos pusiausvyrai pasiekti yra trumpesnis nei dvigubas laikas adsorbcijos pusiausvyrai pasiekti ir bendra desorbcija sudaro daugiau kaip 75 % adsorbuoto kiekio.

#### 1.9.4.3. Desorbcijos izotermės

Freundlichio desorbcijos izotermės apskaičiuojamos dirvožemiams, kuriems buvo apskaičiuojamos adsorbcijos izotermės. Desorbcijos bandymas atliekamas, kaip aprašyta skirsnyje „Desorbcijos kinetika“, išskyrus tai, kad vandeninė fazė analizuojama tik vieną kartą, kai nusistovi desorbcijos pusiausvyra. Apskaičiuojamas desorbuotos bandomosios medžiagos kiekis. Desorbcijos pusiausvyros sąlygomis likęs dirvožemiu adsorbuotos bandomosios medžiagos kiekis grafiškai pateikiamas kaip bandomosios medžiagos tirpalo pusiausvyros koncentracijos funkcija (žr. „Duomenys ir ataskaita“ ir 5 priedėlį).

## 2. DUOMENYS IR ATASKAITA

Analizės duomenys pateikiami lentelėse (žr. 6 priedėlį). Pateikiami atskiri matavimai ir apskaičiuotos vidutinės vertės. Adsorbcijos izotermės pateikiamos grafiškai. Apskaičiavimai daromi, kaip nurodyta toliau.

Atliekant šį bandymą laikoma, kad  $1 \text{ cm}^3$  vandeninio tirpalo masė yra 1 g. Dirvožemio/tirpalo santykis gali būti išreikštas  $m/m$  ar  $m/v$ , skaitmeninė šių dydžių vertė yra vienoda.

### 2.1. ADSORBCIJA

Adsorbcija  $(A_{t_i})$  yra apibrėžiama bandymo sąlygomis dirvožemiu adsorbuotos medžiagos procentine dalimi nuo jos kiekio bandymo pradžioje. Jei bandomoji medžiaga yra stabili ir indo sienelės jos žymiai neadsorbuoja,  $(A_{t_i})$  kiekvienu laiko momentu  $t_i$  apskaičiuojama pagal lygtį:

$$A_{t_i} = \left( \frac{(m_s^{\text{ads}}(t_i) \cdot 100)}{(m_0)} \right) (\%) \quad (3)$$

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 ( $\mu\text{g}$ ),

$m_0$  = bandymo pradžioje mėgintuvėlyje esančios bandomosios medžiagos masė ( $\mu\text{g}$ ).

Informacija, kaip apskaičiuoti adsorbciją  $(A_{t_i})$  lygiagrečiuoju ir nuosekliuoju metodu, išsamiai aprašyta 5 priedėlyje.

Pasiskirstymo koeficientas  $K_d$  yra medžiagos kiekio dirvožemio fazėje ir vandeninio tirpalo masės koncentracijos santykis bandymo sąlygomis, pasiekus adsorbcijos pusiausvyrą.

$$K_d = \left( \frac{(C_s^{\text{ads}}(\text{eq}))}{(C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq}))} \right) = \left( \frac{(m_s^{\text{ads}}(\text{eq}))}{(m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq}))} \right) \cdot \left( \frac{(V_0)}{(m_{\text{soil}})} \right) (\text{cm}^3 \text{ g}^{-1}) \quad (4)$$

čia:

$(C_s^{\text{ads}}(\text{eq}))$  = dirvožemiu adsorbuotos medžiagos kiekis adsorbcijos pusiausvyros sąlygomis ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ),

$(C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq}))$  = medžiagos vandeninės fazės masės koncentracija adsorbcijos pusiausvyros sąlygomis ( $\mu\text{g g}^{-3}$ ). Ši koncentracija nustatoma analizės būdu atsižvelgiant į vertes, gautas tušciaisiais bandymais;



$(m_s^{ads}(eq))$  = dirvožemiu adsorbuotos medžiagos masė adsorbcijos pusiausvyros sąlygomis ( $\mu\text{g}$ );

$(m_{aq}^{ads}(eq))$  = tirpale esančios medžiagos masė adsorbcijos pusiausvyros sąlygomis ( $\mu\text{g}$ );

$m_{soil}$  = dirvožemio fazės kiekis, išreikštas sauso dirvožemio mase ( $\text{g}$ );

$V_o$  = sąlytyje su dirvožemiu esančios vandeninės fazės pradinis tūris ( $\text{cm}^3$ ).

$A_{eq}$  ir  $K_d$  santykis aprašomas lygtimi:

$$K_d = \left( \frac{A_{eq}}{100 - A_{eq}} \right) \cdot \left( \frac{V_o}{m_{soil}} \right) (\text{cm}^3 \text{ g}^{-1}) \quad (5)$$

čia:

$A_{eq}$  = adsorbcijos procentinė dalis adsorbcijos pusiausvyros sąlygomis %

Pagal organinę anglį normalizuotas adsorbcijos koeficientas  $K_{oc}$  susieja pasiskirstymo koeficientą  $K_d$  ir dirvožemio bandinio organinės anglies kiekį:

$$K_{oc} = K_d \cdot \left( \frac{100}{\%OC} \right) (\text{cm}^3 \text{ g}^{-1}) \quad (6)$$

čia:

OC % = organinės anglies dirvožemio bandinyje procentinė dalis ( $\text{g g}^{-1}$ ).

$K_{oc}$  koeficientas rodo vienintelę vertę, kuri apibūdina daugiausia nepolinių organinių cheminių medžiagų pasiskirstymą tarp dirvožemio organinės anglies ar nuosėdų ir vandens. Šių cheminių medžiagų adsorbcija susiejama su organinės medžiagos kiekiu adsorbuojančioje kietojoje medžiagoje (7); taigi  $K_{oc}$  vertės priklauso nuo humusinių dalių, kurių sorbcijos galia labai skiriasi dėl kilmės, genezės ir t. t. specifinių charakteristikų.

### 2.1.1. Adsorbcijos izotermės

Freundlichio adsorbcijos izotermių lygtis susieja adsorbuotos bandomosios medžiagos kiekį ir bandomosios medžiagos tirpalo koncentraciją pusiausvyros sąlygomis (8 lygtis).

Duomenys apdorojami, kaip nurodyta skirsnyje „Adsorbcija“, ir kiekvienam mėgintuvėliui po adsorbcijos bandymo apskaičiuojamas dirvožemiu adsorbuotos bandomosios medžiagos kiekis ( $C_s^{ads}(eq)$ ), kitur žymimas  $x/m$ ). Daroma prielaida, kad pusiausvyra yra pasiekta ir kad ( $C_s^{ads}(eq)$ ) rodo pusiausvyros vertę:

$$C_s^{ads}(eq) = \left( \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_{soil}} \right) = \left( \frac{(C_o - C_{aq}^{ads}(eq)) \cdot V_o}{m_{soil}} \right) (\mu\text{g g}^{-1}) \quad (7)$$

Freundlichio adsorbcijos lygtis pateikta (8):

$$C_s^{ads}(eq) = K_F^{ads} \cdot C_{aq}^{ads}(eq)^{1/n} (\mu\text{g g}^{-1}) \quad (8)$$

ar tiesės pavidalu:

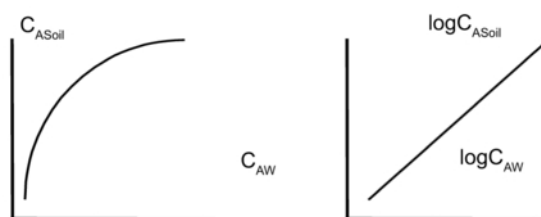
$$\log C_s^{ads}(eq) = \left( \frac{\log K_F^{ads} + 1}{n \cdot \log C_{aq}^{ads}(eq)} \right) \quad (9)$$

čia:

$(K_F^{ads})$  = Freundlichio adsorbcijos koeficientas; jo dimensija yra  $\text{cm}^3 \text{ g}^{-1}$ , tik jei  $1/n = 1$ ; visais kitais atvejais  $i$  ( $K_F^{ads}$ ) ( $\mu\text{g}^{1-1/n} (\text{cm}^3)^{1/n} \text{ g}^{-1}$ );

$n$  = 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  $l/n$ . Taip pat apskaičiuojamas logaritminės lygties koreliacijos koeficientas  $r^2$ . Tokių grafikų pavyzdys pateiktas 2 pav.



2 pvz., 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 skirsnyje „Desorbcija“. Jei tirpiklis su vandeniu maišosi blogiau, reikia nustatyti regeneruotos medžiagos kiekį.

Adsorbcijos atveju masių balansas MB apskaičiuojamas, kaip nurodyta toliau. Daroma prielaida, kad narys ( $m_E$ ) atitinka bandomosios cheminės medžiagos, organiniu tirpikliu ekstrahuojamos iš dirvožemio ir nuo bandymo indo sienelių, masių sumą:

$$MB = \left( \frac{((V_{rec} \cdot C_{aq}^{ads}(eq) + m_E) \cdot 100)}{(V_0 \cdot C_0)} \right) (\%) \quad (10)$$

čia:

MB = masių balansas (%),

$m_E$  = bandomosios medžiagos, dviem pakopomis ekstrahuotos iš dirvožemio ir nuo sienelių, bendroji masė ( $\mu\text{g}$ );

$C_0$  = sąlytyje su dirvožemiu esančio bandomojo tirpalo pradinė masės koncentracija ( $\mu\text{g cm}^{-3}$ ),

$V_{rec}$  = adsorbcijos pusiausvyros sąlygomis regeneruoto tirpalo virš nuosėdų tūris ( $\text{cm}^{-3}$ ).

### 2.2. DESORBCIJA

Desorbcija (D) apibrėžiama kaip desorbuotos bandomosios medžiagos procentinė dalis nuo medžiagos, prieš tai adsorbuotos bandymo sąlygomis, kiekio:

$$D_{t_i} = \left( \frac{(m_{aq}^{des}(t_i))}{(m_s^{ads}(eq))} \right) \cdot 100 (\%) \quad (11)$$

čia:

$(D_{t_i})$  = desorbcijos procentinė dalis laiko momentu  $t_i$  (%),

$(m_{aq}^{des}(t_i))$  = laiko momentu  $t_i$  ( $\mu\text{g}$ ) nuo dirvožemio desorbuotos bandomosios medžiagos masė,

$(m_s^{ads}(eq))$  = adsorbcijos pusiausvyros sąlygomis dirvožemiu adsorbuotos bandomosios medžiagos masė ( $\mu\text{g}$ ).

Informacija, kaip apskaičiuoti desorbcijos procentinę dalį  $D_{t_i}$  lygiagrečiuoju ir nuosekliuoju metodu, išsamiai aprašyta 5 priedėlyje.



Tariamasis desorbcijos koeficientas ( $K_{des}$ ) bandymo sąlygomis yra dirvožemio fazėje likusios medžiagos kiekio ir desorbuotos medžiagos vandeninio tirpalo masės koncentracijos santykis pasiekus desorbcijos pusiausvyrą:

$$K_{des} = \left( \left( \frac{m_s^{ads}(eq) - m_{aq}^{des}(eq)}{m_{aq}^{des}(eq)} \right) \left( \frac{V_T}{m_{soil}} \right) \right) (\text{cm}^3 \text{ g}^{-1}) \quad (12)$$

čia:

$K_{des}$  = desorbcijos koeficientas ( $\text{cm}^3 \text{ g}^{-1}$ );

$(m_{aq}^{des}(eq))$  = nuo dirvožemio desorbuotos bandomosios medžiagos bendroji masė desorbcijos pusiausvyros sąlygomis ( $\mu\text{g}$ );

$V_T$  = atliekant desorbcijos kinetikos bandymą sąlytyje su dirvožemiu esančios vandeninės fazės bendrasis tūris ( $\text{cm}^3$ ).

Kaip apskaičiuoti  $(m_{aq}^{des}(eq))$  nurodyta 5 priedėlio skirsnyje „Desorbcija“.

Pastaba.

Jei prieš tai atliekant adsorbcijos bandymą buvo taikomas lygiagretusis metodas, laikoma, kad tūris  $V_T$  12 lygtyje yra lygus  $V_o$ .

### 2.2.1. Desorbcijos izotermės

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:

$$C_s^{des}(eq) = \left( \frac{m_s^{ads}(eq) - m_{aq}^{des}(eq)}{m_{soil}} \right) (\mu\text{g g}^{-1}) \quad (13)$$

$(m_{aq}^{des}(eq))$  yra apibrėžiama taip:

$$m_{aq}^{des}(eq) = m_m^{des}(eq) \cdot \left( \frac{V_o}{V_r^F} \right) - m_{aq}^A (\mu\text{g}) \quad (14)$$

čia:

$(C_s^{des}(eq))$  = bandomosios medžiagos, kuri liko adsorbuota dirvožemiu desorbcijos pusiausvyros sąlygomis, kiekis ( $\mu\text{g g}^{-1}$ );

$(m_m^{des}(eq))$  = medžiagos, analiziškai nustatytos vandeninėje terpėje desorbcijos pusiausvyros sąlygomis, masė ( $\mu\text{g}$ );

$(m_{aq}^A)$  = bandomosios medžiagos, likusios po adsorbcijos pusiausvyros bandymo dėl nevisiško tūrio pakeitimo, masė ( $\mu\text{g}$ );

$(m_{aq}^{des}(eq))$  = medžiagos, esančios tirpale adsorbcijos pusiausvyros sąlygomis, masė ( $\mu\text{g}$ );

$$m_{aq}^A = m_{aq}^{ads}(eq) \cdot \left( \frac{V_o - V_R}{V_o} \right) \quad (15)$$

$(V_r^F)$  = tirpalo, paimto iš mėgintuvėlio bandomosios medžiagos kiekiui nustatyti desorbcijos pusiausvyros sąlygomis, tūris ( $\text{cm}^3$ )

$V_R$  = tirpalo virš nuosėdų, pašalinto iš mėgintuvėlio pasiekus adsorbcijos pusiausvyrą ir pakeisto tokiu pat tūriu 0,01 M  $\text{CaCl}_2$  tirpalo, tūris ( $\text{cm}^3$ );

Freundlichio desorbcijos lygtis pateikta (16):

$$C_s^{des}(eq) = K_F^{des} \cdot C_{aq}^{des}(eq)^{1/n} (\mu\text{g g}^{-1}) \quad (16)$$

ar tiesės pavidalu:

$$\log C_s^{\text{des}}(\text{eq}) = \log K_F^{\text{des}} + 1/n \log C_{\text{aq}}^{\text{des}}(\text{eq}) \quad (17)$$

čia:

$(K_F^{\text{des}})$  = Freundlichio desorbcijos koeficientas;

$n$  = regresijos konstanta;

$(C_{\text{aq}}^{\text{des}}(\text{eq}))$  = medžiagos vandeninėje fazėje masės koncentracija desorbcijos pusiausvyros sąlygomis ( $\mu\text{g cm}^{-3}$ ).

Gali būti nubrėžti 16 ir 17 lygčių grafikai ir taikant 17 lygtį regresijos analizės metodu apskaičiuojami  $(K_F^{\text{des}})$  ir  $1/n$ .

Pastaba:

Jei Freundlichio adsorbcijos ar desorbcijos laipsnio rodiklis  $1/n$  yra lygus 1, Freundlichio lygčių adsorbcijos ar desorbcijos konstantos ( $(K_F^{\text{ads}})$  ir  $(K_F^{\text{des}})$ ) bus lygios atitinkamai adsorbcijos ar desorbcijos pusiausvyros konstantoms ( $K_d$  ir  $K_{\text{des}}$ ), ir  $C_s$  priklausomybės nuo  $C_{\text{aq}}$  grafikas bus tiesė. Jei laipsnių rodikliai nėra lygūs 1,  $C_s$  priklausomybės nuo  $C_{\text{aq}}$  grafikai nebus tiesės ir adsorbcijos bei desorbcijos konstantos keisis išilgai izotermių.

#### 2.2.2. Bandyto ataskaita

Bandyto ataskaitoje turi būti ši informacija:

- išsamus naudotų dirvožemio bandinių identifikavimas, įskaitant:
- geografinę vietos nuorodą (platuma, ilguma),
- bandinio ėmimo datą,
- naudojimo paskirtį (pvz., žemės ūkio paskirties dirvožemis, miškas ir t. t.),
- bandinio ėmimo gylį,
- smėlio/dumblo/molio kiekį,
- pH vertes (0,01 M CaCl<sub>2</sub>),
- organinės anglies kiekį,
- organinės medžiagos kiekį,
- azoto kiekį,
- C/N santykį,
- katjonų mainų gebą (mmol/kg),
- visą informaciją apie dirvožemio bandinių rinkimą ir laikymą,
- jei tinka, visą informaciją, reikalingą bandomosios medžiagos adsorbcijai/desorbcijai aiškinti,
- metodus, taikomus kiekvienam parametru nustatyti,

- atitinkama informacija apie bandomąją medžiagą,
- bandymo temperatūra,
- centrifugavimo sąlygos,
- analizės metodika, taikyta bandomajai medžiagai analizuoti,
- priežastys, kurios pagrįstų tirpinimo medžiagos naudojimą pradiniam bandomosios medžiagos tirpalui ruošti,
- apskaičiavimuose darytų pataisų aiškinimai, jei tinka,
- duomenys pagal formą (6 priedėlis) ir grafikai,
- visa informacija ir pastebėjimai, padedantys aiškinti bandymų rezultatus.

## 3.

**NUORODOS**

- 1) Kukowski H. and 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.
- 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) Hasset J.J., and Banwart W.L., (1989), „The sorption of nonpolar organics by soils and sediments“ in Reactions and Movement of Organic Chemicals in Soils. Soil Science Society of America (S.S.S. A), Special Publication no. 22, pp 31–44.
- 15) van Genuchten M. Th., Davidson J.M., and Wierenga P.J., (1974), „An evaluation of kinetic and equilibrium equations for the prediction of pesticide movement through porous media“. Soil Sci. Soc. Am. Proc, Vol. 38(1), 29–35.
- 16) McCall P.J., Laskowski D.A., Swann R.L., and Dishburger H.J., (1981), „Measurement of sorption coefficients of organic chemicals and their use, in environmental fate analysis“, in Test Protocols for Environmental Fate and Movement of Toxicants. Proceedings of AOAC Symposium, AOAC, Washington DC.
- 17) Lambert S.M., Porter P.E., and Schieferrstein R.H., (1965), „Movement and sorption of chemicals applied to the soil“. Weeds, 13, 185–190.
- 18) Rhodes R.C., Belasco I.J., and Pease H.L., (1970) „Determination of mobility and adsorption of agrochemicals in soils“. J. Agric. Food Chem., 18, 524–528.
- 19) Russell M.H., (1995), „Recommended approaches to assess pesticide mobility in soil“ in Environmental Behavior of Agrochemicals (ed. T.R. Roberts and P.C. Kearney). John Wiley & Sons Ltd.
- 20) Esser H.O., Hemingway R.J., Klein W., Sharp D.B., Vonk J.W. and Holland P.T., (1988), „Recommended approach to the evaluation of the environmental behavior of pesticides“, IUPAC Reports on Pesticides (24). Pure Appl. Chem., 60, 901–932.
- 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 (C-AT. 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.

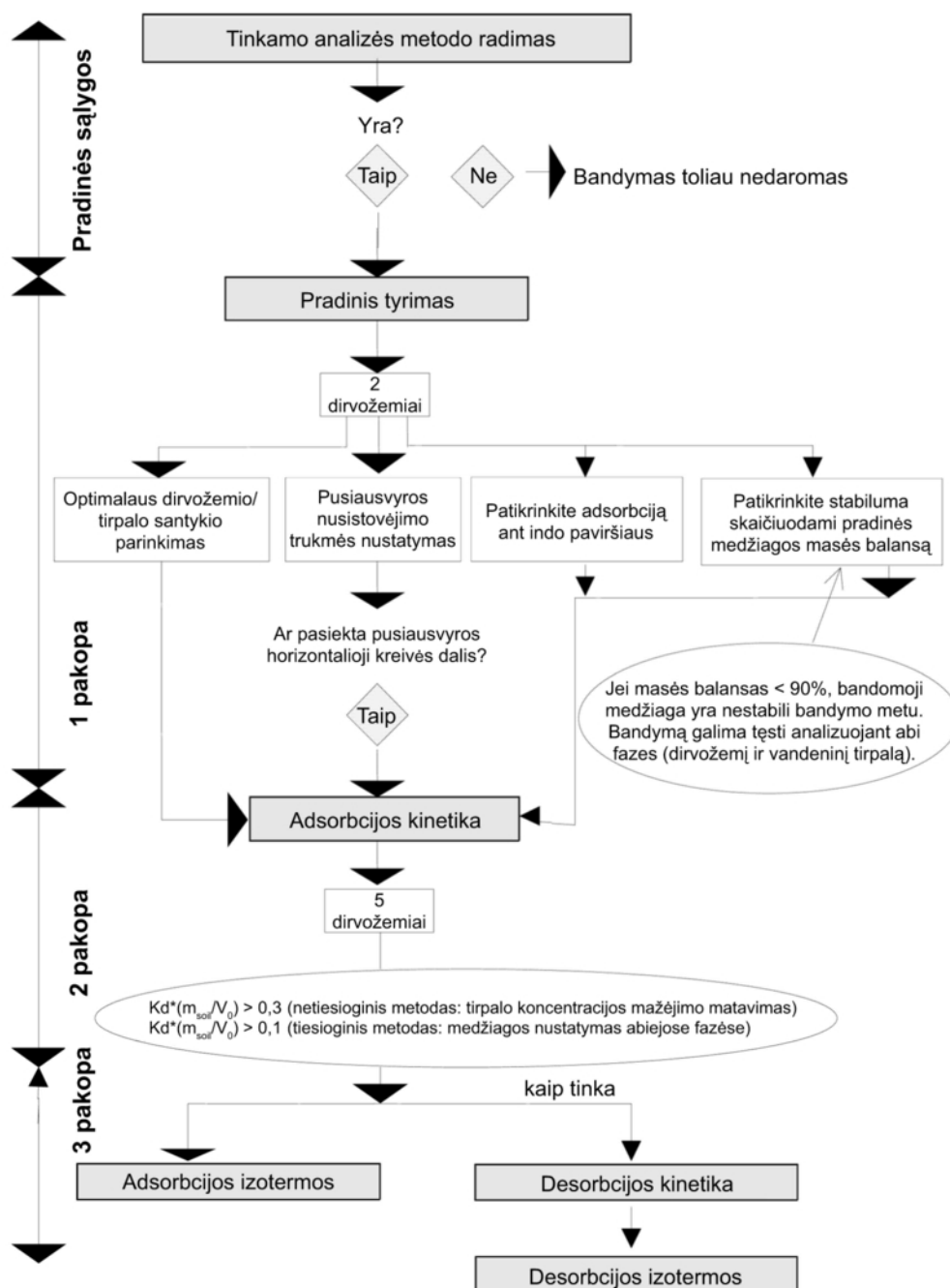
- 32) Gustafson D.I., (1989), „Groundwater ubiquity score: a simple method for assessing pesticide teachability“. *J. Environ. Toxic. Chem.*, 8(4), 339–357.
- 33) Leistra M., and Dekkers W.A., (1976). „Computed effects of adsorption kinetics on pesticide movement in soils“. *J. of Soil Sci.*, 28, 340–350.
- 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), „Sorpton 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.
- 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 montomrilonite: 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.
- 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.

- 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.L., Wood S.G., and Means J.C., (1981), „Sorption of *p*-Naphthol: 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).

## 1 PRIEDĖLIS

## Bandyto schema





## 2 priedėlis

ANALIZĖS METODO IR KONCENTRACIJOS POKYČIO ĮTAKA ADSORBCIJOS  
REZULTATŲ TIKSLUMUI

Iš toliau pateiktamos lentelės (84) matyti, kad, jei tirpale esančios bandomosios medžiagos pradinės masės ( $m_0 = 110 \mu\text{g}$ ) ir pusiausvyros masės ( $(m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})) = 100 \mu\text{g}$ ) skirtumas labai mažas, dėl 5 % paklaidos matuojant pusiausvyros koncentraciją, 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  $V_0 = 100 \text{ cm}^3$

	$(m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq}))$ ( $\mu\text{g}$ )	$(C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq}))$ ( $\mu\text{g cm}^{-3}$ )	R	$(m_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq})^*)$ ( $\mu\text{g}$ )	$(C_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq})^*)$ ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	R‡	$K_d^*$	R‡
<b>Kai A = 9 %</b>								
$m_0 = 110 \mu\text{g ar}$ $C_0 = 1,100 \mu\text{g/cm}^3$	100	1,000	Tikroji vertė	10	1,00	Tikroji vertė	1	
	101	1,010	1 %	9	0,90	10 %	0,891	10,9 %
	105	1,050	5 %	5	0,50	50 %	0,476	52,4 %
	109	1,090	9 %	1	0,10	90 %	0,092	90,8 %
<b>Kai A = 55 %</b>								
$m_0 = 110 \mu\text{g ar}$ $C_0 = 1,100 \mu\text{g/cm}^3$	50,0	0,500	Tikroji vertė	60,0	6,00	Tikroji vertė	12,00	
	50,5	0,505	1 %	59,5	5,95	0,8 %	11,78	1,8 %
	52,5	0,525	5 %	57,5	5,75	4,0 %	10,95	8,8 %
	55,0	0,550	10 %	55,0	5,50	8,3 %	10,00	16,7 %
<b>Kai A = 99 %</b>								
$m_0 = 110 \mu\text{g ar}$ $C_0 = 1,100 \mu\text{g/cm}^3$	1,100	0,011	Tikroji vertė	108,9	10,89	Tikroji vertė	990	
	1,111	0,01111	1 %	108,889	10,8889	0,01 %	980	1,0 %
	1,155	0,01155	5 %	108,845	10,8845	0,05 %	942	4,8 %
	1,21	0,0121	10 %	108,790	10,8790	0,10 %	899	9,2 %

$$(*m_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq})) = ((m_0) - (m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq}))) \cdot (C_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq})) = \left( \frac{((C_0) - (C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq}))V_0)}{(m_{\text{soil}})} \right) \cdot K_d = \left( \frac{((m_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq}))}{((m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})))} \right) \times \left( \frac{(V_0)}{(m_{\text{soil}})} \right)$$

$m_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq})$  = bandomosios medžiagos dirvožemio fazėje masė pusiausvyros sąlygomis,  $\mu\text{g}$ ;

$(m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq}))$  = bandomosios medžiagos vandeninėje fazėje masė pusiausvyros sąlygomis,  $\mu\text{g}$ ;

$(C_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq}))$  = 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‡ = apskaičiuota paklaida dėl analizinės paklaidos R.

## 3 priedėlis

**K<sub>D</sub> VERTINIMO METODAI**

1. Vertinimo metodai leidžia daryti K<sub>d</sub> vertės prognozę, pagrįstą koreliacija su, pvz., P<sub>ow</sub> 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<sub>oc</sub> ar K<sub>om</sub> vertės ir po to netiesiogiai pagal šias lygtis apskaičiuojama K<sub>d</sub>:

$$K_{oc} = K_d \cdot \left( \frac{100}{(\%oc)} \right) (\text{cm}^3 \text{g}^{-1}) \quad K_{om} = \left( \frac{K_d}{(1,724)} \right) \cdot \left( \frac{100}{(\%oc)} \right) (\text{cm}^3 \text{g}^{-1})$$

2. Šių korelacijų koncepcija pagrįsta dviem prielaidomis: 1) tai dirvožemio organinė medžiaga, kuri iš esmės daro įtaką medžiagos adsorbacijai; 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<sub>ow</sub> 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 pasiskirstymo koeficiento (n-oktanolis/vanduo) bei tirpumo vandenyje korelacijų pavyzdžiai pateikti atitinkamai 1 ir 2 lentelėse.

## 1 lentelė

**Koreliacijos tarp adsorbcijos pasiskirstymo koeficiento ir pasiskirstymo koeficiento (n-oktanolis/vanduo) pavyzdžiai; kiti pavyzdžiai pateikti (12) (68)**

Medžiagos	Koreliacijos lygtys	Autoriai
Pakeisto karbamido dariniai	$\log K_{om} = 0,69 + 0,52 \log P_{ow}$	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	$\log K_{oc} = 4,273 - 0,686 \log S_w$	Hassetal. (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)

## 4 priedėlis

**SKAIČIAVIMAI CENTRIFUGAVIMO SĄLYGOMS APIBRĖŽTI**

1. Centrifugavimo trukmė nustatoma pagal šią formulę darant prielaidą, kad dalelės yra rutulio formos:

$$t = \left( \frac{9}{2} \right) \left[ \frac{(\eta)}{(\omega^2 r p^2 (\rho_s - \rho_{aq}))} \right] \ln(R_b/R_i) \quad (1)$$

Siekiant supaprastinti, visi parametrai yra išreikšti ne SI vienetais (g, cm).

Čia:

$\omega$	=	sukimosi greitis (= $2 \pi \text{ rpm}/60$ ), $\text{rad s}^{-1}$ ,
$\text{rpm}$	=	apsisukimų dažnis, $\text{min}^{-1}$ , m
$\eta$	=	tirpalo klampumas, $\text{g s}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ,
$r_p$	=	dalelių spindulys, cm,
$\rho_s$	=	dirvožemio tankis, $\text{g cm}^{-3}$ ,
$\rho_{aq}$	=	tirpalo tankis, $\text{g cm}^{-3}$ ,
$R_t$	=	nuotolis nuo centrifugos rotoriaus centro iki tirpalo centrifugavimo mėgintuvėlyje viršaus, cm,
$R_b$	=	nuotolis nuo centrifugos rotoriaus centro iki tirpalo centrifugavimo mėgintuvėlyje apačios, cm,
$R_b - R_t$	=	dirvožemio ir tirpalo mišinio stulpelio centrifugavimo mėgintuvėlyje ilgis, cm.

Kad būtų garantuotas visiškas atskyrimas, praktikoje dažniausiai vartojama trukmė yra lygi dvigubai apskaičiuotai trukmei.

- 1 lygtis gali būti dar supaprastinta darant prielaidą, kad tirpalo klampumas ( $\eta$ ) ir tankis ( $\rho_{aq}$ ) yra lygūs vandens  $25^\circ\text{C}$  klampumui ir tankiui; taigi,  $\eta = 8,95 \times 10^{-3} \text{ g s}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  ir  $\rho_{aq} = 1,0 \text{ g cm}^{-3}$ .

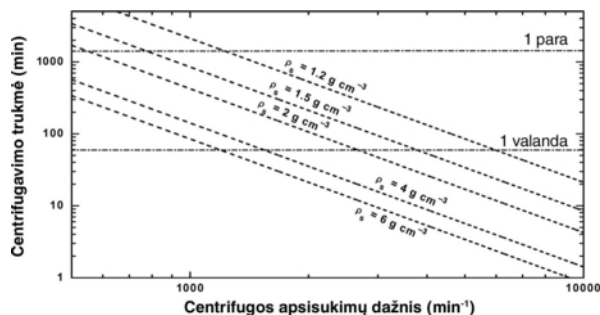
Tuomet centrifugavimo trukmė išreiškiama 2 lygtimi:

$$t = \left( \frac{(3.7)}{\left( (\text{rpm})^2 \cdot (r_p)^2 (\rho_s - l) \right)} \right) \ln \left( \frac{(R_b)}{(R_t)} \right) \quad (2)$$

- Iš 2 lygties aišku, kad norint pasiekti tam tikro dydžio dalelių atsiskyrimą (mūsų atveju  $0,1 \mu\text{m}$  spindulio) centrifugavimo režimui, t. y. laikui ( $t$ ) ir apsisukimų dažniui ( $\text{min}^{-1}$ ), 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.
- 1 pvz., pavaizduotas centrifugavimo trukmės ( $t$ ) kitimas pagal centrifugos apsisukimų dažnį ( $\text{min}^{-1}$ ) esant skirtingiems dirvožemių tankiams ( $\rho_s$ ) (1a pav.) ir skirtingiems mišinio stulpelio centrifugavimo mėgintuvėlyje ilgiams (1b pav.). Iš 1a pvz., matyti, kad dirvožemio tankio įtaka yra akivaizdi; pvz., tradicinis centrifugavimas  $3000 \text{ min}^{-1}$  dažniu trunka maždaug 240 min, kai dirvožemio tankis  $1,2 \text{ g cm}^{-3}$ , tuo tarpu ši trukmė yra tik 50 min, jei tankis  $2,0 \text{ g cm}^{-3}$ . Panašiai, pagal 1b pvz., centrifuguojant tradiciniu  $3000 \text{ min}^{-1}$  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.
- 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.

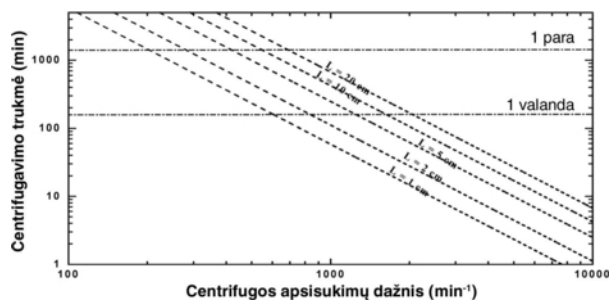
Jei bandymus atliekanti laboratorija turi ultracentrifugavimo ar ultrafiltravimo priemones, medžiagos adsorbcija/desorbcija dirvožemiu galėtų būti ištirta išsamiau, įskaitant informaciją apie medžiagos adsorbciją koloidinėmis dalelėmis. Šiuo atveju norint atskirti tris fazes: dirvožemį, koloidines daleles ir tirpalą, turi būti taikomas ultracentrifugavimas  $60\,000\text{ min}^{-1}$  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<sup>-1</sup>) esant skirtingam dirvožemio tankiui (ρ<sub>s</sub>). R<sub>t</sub> = 10 cm, R<sub>b</sub> - R<sub>t</sub> = 10 cm, η = 8,95 × 10<sup>-3</sup> g s<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> ir ρ<sub>aq</sub> = 1,0 g cm<sup>-3</sup> esant 25 °C temperatūrai.

1b pav.

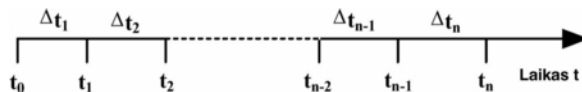


Centrifugavimo trukmės (t) kitimas pagal centrifugos apsisukimų dažnį (min<sup>-1</sup>) esant skirtingam mišinio stulpelio centrifugavimo mėgintuvėlyje ilgiui (R<sub>b</sub> - R<sub>t</sub>) = L; R<sub>t</sub> = 10 cm, η = 8,95 × 10<sup>-3</sup> g s<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>, ρ<sub>aq</sub> = 1,0 g cm<sup>-3</sup> esant 25 °C temperatūrai ir ρ<sub>s</sub> = 2,0 g cm<sup>-3</sup>.

## 5 priedėlis

## ADSORBCIJOS A (%) IR DESORBCIJOS D (%) APSKAIČIAVIMAS

Metodikai taikyta tokia laiko schema:



Darant visus skaičiavimus daroma prielaida, kad bandomoji medžiaga yra stabili, ir jos labai neadsorbuoja indo sienelės.

## ADSORBCIJA A (A %)

## a) Lygiagretusis metodas

Kiekvienam mėgintuvėliui (i) kiekienu 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:

$$m_0 = C_0 V_0 (\mu\text{g}) \quad (2)$$

$$(m_s^{\text{ads}}(t_i)) = (m_0 - C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(t_i) V_0) (\mu\text{g}) \quad (3)$$

kai:

$A_{t_i}$  = adsorbcijos procentinė dalis (%) laiko momentu  $t_i$ ;

$(m_s^{\text{ads}}(t_i))$  = dirvožemiui adsorbuotos bandomosios medžiagos masė laiko momentu  $t_i$ , kai buvo atliekama analizė ( $\mu\text{g}$ );

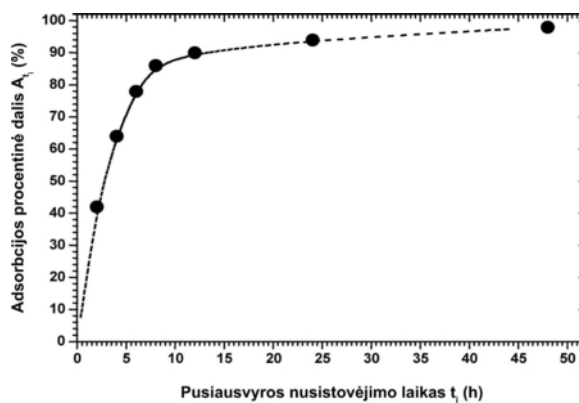
$m_0$  = bandymo pradžioje mėgintuvėlyje buvusios bandomosios medžiagos masė ( $\mu\text{g}$ );

$C_0$  = sąlytyje su dirvožemiui esančio bandomojo tirpalo pradinė masės koncentracija ( $\mu\text{g cm}^{-3}$ );

$(C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(t_i))$  = medžiagos vandeninės fazės masės koncentracija laiko momentu  $t_i$ , kai atliekama analizė ( $\mu\text{g} \times \text{cm}^{-3}$ ); ši koncentracija nustatoma analizės būdu atsižvelgiant į tuščiuosiuose bandymuose gautas vertes,

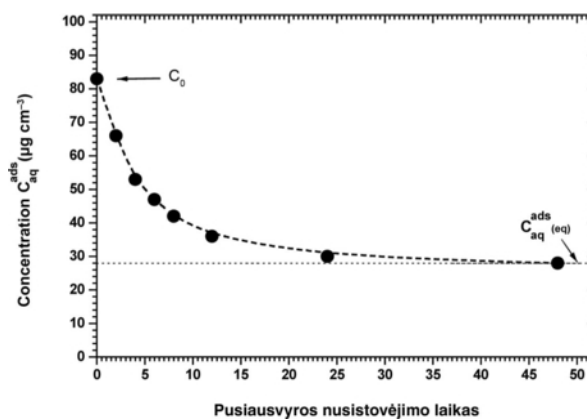
$V_0$  = sąlytyje su dirvožemiui esančio bandomojo tirpalo pradinis tūris ( $\text{cm}^3$ ).

Adsorbcijos procentinės dalies  $A_{t_i}$  ar  $C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(t_i)$  vertės pažymimos grafike pagal laiką ir nustatomas sorbcijos pusiausvyros pasiekimo laikas. Tokių grafikų pavyzdžiai pateikti atitinkamai 1 pvz., ir 2 pav.



1 pav.

Adsorbcijos pusiausvyros grafikas



2 pav.

Bandomosios medžiagos masės koncentracijos ( $C_{aq}$ ) kitimas laike

b) Nuoseklusis metodas

Toliau pateiktose lygtyse atsižvelgiama į tai, kad pagal adsorbcijos matavimo metodiką bandomosios medžiagos kiekis tam tikrais laiko tarpais nustatomas mažose vandeninės fazės alikvotinėse dalyse.

— Kiekvienam laiko tarpui dirvožemiui adsorbuotos medžiagos kiekis apskaičiuojamas taip:

— pirmajam laiko tarpui  $\Delta t_1 = t_1 - t_0$

$$(m_s^{ads}(\Delta t_1)) = (m_0 - m_m^{ads}(t_1)) \cdot \left( \frac{(V_0)}{(V_a)} \right) \quad (4)$$

— 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  $\Delta t_n = t_n - t_{n-1}$

$$(m_m^{\text{ads}}(\Delta t_n)) = (m_m^{\text{ads}}(t_{n-1})) \cdot \left( \frac{V_0 - (n-2) \cdot V_a^A}{V_a^A} \right) - m_m^{\text{ads}}(t_n) \cdot \left( \frac{V_0 - (n-1) \cdot V_a^A}{V_a^A} \right) \quad (7)$$

— 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  $t_{\text{eq}}$ :

— dirvožemiu adsorbuotos bandomosios medžiagos masė lygi:

$$m_s^{\text{ads}}(\text{eq}) = \sum_{\Delta t_i=1}^n m_s^{\text{ads}}(\Delta t_i) \quad (10)$$

— bandomosios medžiagos tirpale masė yra lygi:

$$\left( m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq}) = m_0 - \sum_{\Delta t_i=1}^n m_s^{\text{ads}}(\Delta t_i) \right) \quad (11)$$

— 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 ( $\mu\text{g}$ );

$(m_m^{\text{ads}})(t_1), (m_m^{\text{ads}})(t_2), \dots, (m_m^{\text{ads}})(t_n)$  = atitinkamai laiko momentu  $t_1, t_2, t_n$  nustatyta bandomosios medžiagos masė ( $\mu\text{g}$ );

$(m_s^{\text{ads}}(\text{eq}))$  = adsorbcijos pusiausvyros sąlygomis dirvožemiu adsorbuotos medžiagos masė ( $\mu\text{g}$ );

$(m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq}))$  = adsorbcijos pusiausvyros sąlygomis tirpale esančios medžiagos masė ( $\mu\text{g}$ );

$(V_a^A)$  = alikvotinės dalies, kurioje nustatoma bandomoji medžiaga, tūris ( $\text{cm}^3$ );

$(A_{\Delta t_i})$  = adsorbcijos, atitinkančios laiko tarpą  $\Delta t_i$ , procentinė dalis (%);

$(A_{\text{eq}})$  = 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  $\text{CaCl}_2$  tirpalo tūriu.

## a) Lygiagretusis metodas

Laiko momentu  $t_i$  matuojama masė bandomosios medžiagos, esančios iš mėgintuvėlio (i) paimtame vandens terpės tūryje ( $V_r^i$ ), ir desorbuotos medžiagos masė apskaičiuojama pagal lygtį:

$$(m_{\text{aq}}^{\text{des}}(t_i)) = (m_{\text{m}}^{\text{des}}(t_i)) \cdot \left( \frac{V_0}{V_r^i} \right) - (m_{\text{aq}}^{\text{A}}) \quad (13)$$

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 ( $\Delta t_i$ ) desorbuotos medžiagos masė nustatoma pagal lygtį:

$$(m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_i)) = (m_{\text{aq}}^{\text{des}}(t_i)) - \left( \sum_{j=1}^{i-1} m_{\text{aq}}^{\text{des}}(j) \right) \quad (14)$$

Desorbcijos procentinė dalis apskaičiuojama:

laiko momentu  $t_i$  pagal lygtį:

$$D_{t_i} = \frac{(m_{\text{aq}}^{\text{des}}(t_i))}{(m_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq}))} \cdot 100(\%) \quad (15)$$

ir per laiko tarpą ( $\Delta t_i$ ) pagal lygtį:

$$D_{\Delta t_i} = \frac{(m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_i))}{(m_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq}))} \cdot 100(\%) \quad (16)$$

čia:

- $(D_{t_i})$  = desorbcijos procentinė dalis laiko momentu  $t_i$  (%),
- $(D_{\Delta t_i})$  = desorbcijos procentinė dalis, atitinkanti laiko tarpą  $\Delta t_i$  (%),
- $(m_{\text{aq}}^{\text{des}}(t_i))$  = laiko momentu  $t_i$  desorbuotos bandomosios medžiagos masė ( $\mu\text{g}$ ),
- $(m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_i))$  = per laiko tarpą  $\Delta t_i$  desorbuotos bandomosios medžiagos masė ( $\mu\text{g}$ ),
- $(m_{\text{m}}^{\text{des}}(t_i))$  = bandomosios medžiagos, analizės būdu nustatytos laiko momentu  $t_i$  analizei paimtame tirpalo tūryje ( $V_r^i$ ) masė ( $\mu\text{g}$ );
- $(m_{\text{aq}}^{\text{A}})$  = bandomosios medžiagos, likusios po adsorbcijos pusiausvyros bandymo dėl nevisiško tūrio pakeitimo, masė ( $\mu\text{g}$ );

$$(m_{\text{aq}}^{\text{A}}) = (m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})) \cdot \left( \frac{V_0 - V_{\text{R}}}{V_0} \right) \quad (17)$$

$(m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq}))$  = tirpale esančios bandomosios medžiagos masė adsorbcijos pusiausvyros sąlygomis ( $\mu\text{g}$ );

$V_{\text{R}}$  = tirpalo virš nuosėdų, pašalinto iš mėgintuvėlio pasiekus adsorbcijos pusiausvyrą ir pakeisto tokiu pat tūriu 0,01 M  $\text{CaCl}_2$  tirpalo, tūris ( $\text{cm}^3$ );

$(V_r^i)$  = tirpalo, paimto iš mėgintuvėlio (i) bandomosios medžiagos kiekiui nustatyti atliekant desorbcijos kinetikos bandymą, tūris ( $\text{cm}^3$ ).

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 tūriū 0,01 M CaCl<sub>2</sub> tirpalu ( $v_R$ ) ir b) sąlytyje su dirvožemiu esančios vandeninės fazės bendras tūris ( $V_T$ ) darant desorbcijos kinetikos bandymą yra pastovus ir apibrėžiamas lygtimi:

$$(V_T) = (V_0) - \left( \sum_{i=1}^n v_a^A(i) \right) \quad (18)$$

Laiko momentu  $t_i$ :

- bandomosios medžiagos masė matuojama mažame alikvotinės dalies tūryje ( $v_a^D$ ) ir desorbuotos medžiagos masė apskaičiuojama pagal lygtį:

$$(m_{aq}^{des}(t_i)) = (m_m^{des}(t_i)) \cdot \left( \frac{(V_T)}{(v_a^D)} \right) - \left( m_{aq}^A \cdot \left( \frac{(V_T - (i-1)v_a^D)}{(V_T)} \right) \right) \quad (19)$$

- desorbcijos procentinė dalis pusiausvyros sąlygomis  $t_i = t_{eq}$ , todėl  $(m_{aq}^{des}(t_i)) = (m_{aq}^{des}(eq))$ .
- desorbcijos procentinė dalis ( $D_{t_i}^D$ ) apskaičiuojama pagal šią lygtį:

$$D_{t_i}^D = \frac{((m_{aq}^{des}(t_i)))}{((m_s^{ads}(eq)))} \cdot 100(\%) \quad (20)$$

Per laiko tarpą ( $\Delta t_i$ ):

Per kiekvieną laiko tarpą desorbuotos medžiagos kiekis apskaičiuojamas taip:

- pirmajam laiko tarpui  $\Delta t_1 = t_1 - t_0$

$$(m_{aq}^{des}(\Delta t_1)) = (m_m^{des}(t_1)) \cdot \left( \frac{(V_T)}{(v_a^D)} \right) - (m_{aq}^A) \text{ and } (m_s^{des}(t_1)) = (m_s^{aq}(eq)) - (m_{aq}^{des}(\Delta t_1)) \quad (21)$$

- antrajam laiko tarpui  $\Delta t_2 = t_2 - t_1$

$$\begin{aligned} (m_{aq}^{des}(\Delta t_2)) &= (m_m^{des}(t_2)) \cdot \left( \frac{(V_T)}{(v_a^D)} \right) - (m_{aq}^{des}(\Delta t_1)) \cdot \left( \frac{(V_T - v_a^D)}{(V_T)} \right) - \left( m_{aq}^A \cdot \left( \frac{(V_T - v_a^D)}{(V_T)} \right) \right) \\ (m_s^{des}(t_2)) &= (m_s^{ads}(eq)) - [m_{aq}^{des}(\Delta t_1) + (m_{aq}^{des}(\Delta t_2))] \end{aligned} \quad (22)$$

- n-ajam laiko tarpui  $\Delta t_n = t_n - t_{n-1}$

$$\begin{aligned} (m_{aq}^{des}(\Delta t_n)) &= \left[ m_m^{des}(t_n) \cdot \left( \frac{(V_T)}{(v_a^D)} \right) - (m_{aq}^A) \cdot \left( \frac{(V_T - (n-1)v_a^D)}{(V_T)} \right) - \left( \sum_{i=1, n \neq 1}^{n-1} \left( \frac{(V_T - (n-i)v_a^D)}{(V_T)} \right) m_{aq}^{des}(\Delta t_i) \right) \right] \\ (m_s^{des}(t_n)) &= m_s^{ads}(eq) - \left( \sum_{i=1, n \neq 1}^n m_{aq}^{des}(\Delta t_i) \right) \end{aligned} \quad (23)$$

Galiausiai desorbcijos procentinė dalis kiekvienam laikotarpiui ( $D_{\Delta t_i}^D$ ) apskaičiuojama pagal šią lygtį:

$$D_{\Delta t_i}^D = \frac{(m_{aq}^{des}(\Delta t_i))}{(m_s^{ads}(eq))} \cdot 100(\%) \quad (24)$$

tuo tarpu desorbcijos procentinė dalis  $D_{t_i}$  laiko momentu  $t_i$ ; nustatoma pagal lygtį:

$$D_{t_i} = \left( \frac{\left( \sum_{j=\Delta t_1}^{\Delta t_i} m_{aq}^{des}(j) \right)}{m_{ads}^{ads}(eq)} \cdot 100 \right) = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_{ads}^{ads}(eq)} \cdot 100(\%) \quad (25)$$

Šiose lygtyse naudoti parametrai apibrėžiami kaip:

$(m_{s}^{des}(\Delta t_1)), (m_{s}^{des}(\Delta t_2)), \dots, (m_{s}^{des}(\Delta t_n))$  = medžiagos, kuri dar liko adsorbuota dirvožemiu pasibaigus atitinkamai laiko tarpams  $\Delta t_1, \Delta t_2, \dots, \Delta t_n$  masė ( $\mu\text{g}$ );

$(m_{aq}^{des}(\Delta t_1)), (m_{aq}^{des}(\Delta t_2)), \dots, (m_{aq}^{des}(\Delta t_n))$  = bandomosios medžiagos, desorbuotos atitinkamai per laiko tarpus  $\Delta t_1, \Delta t_2, \dots, \Delta t_n$  masė ( $\mu\text{g}$ );

$(m_{m}^{des}(t_1)), (m_{m}^{des}(t_2)), \dots, (m_{m}^{des}(t_n))$  = medžiagos masė, nustatyta alikvotinės dalies tūryje ( $v_a^D$ ) atitinkamai laiko momentais  $t_1, t_2, \dots, t_n$ , ( $\mu\text{g}$ );

$V_T$  = vandeninės fazės, esančios sąlytyje su dirvožemiu atliekant desorbcijos kinetikos bandymą pagal nuoseklųjį metodą, bendras tūris ( $\text{cm}^3$ );

$(m_{aq}^A)$  = bandomosios medžiagos, likusios po adsorbcijos pusiausvyros bandymo dėl nevisiško tūrio pakeitimo, masė ( $\mu\text{g}$ );

$$(m_{aq}^A) = \left( \frac{\left( \left( V_0 - \left( \sum_{i=1}^n v_a^A(i) \right) \right) - (V_R) \right)}{\left( V_0 - \left( \sum_{i=1}^n v_a^A(i) \right) \right)} \right) \cdot (m_{aq}^{ads}(eq)) \quad (26)$$

$V_R$  = tirpalo virš nuosėdų, pašalinto iš mėgintuvėlio pasiekus adsorbcijos pusiausvyrą ir pakeisto tokiu pat tūriu 0,01 M  $\text{CaCl}_2$  tirpalo, tūris ( $\text{cm}^3$ );

$(v_a^D)$  = tirpalo, paimto iš mėgintuvėlio (i) bandomosios medžiagos kiekiui nustatyti atliekant desorbcijos kinetikos bandymą, alikvotinės dalies tūris ( $\text{cm}^3$ );

$$(v_a^D \leq 0,02 \cdot V_T) \quad (27)$$

## 6 priedėlis

## DIRVOŽEMIŲ ADSORBCIJA IR DESORBCIJA. DUOMENŲ PATEIKIMO LENTELĖS

Bandyta medžiaga:

Bandytas dirvožemis:

Sauso dirvožemio masės dalis (105 °C, 12h): ..... %

Temperatūra: ..... °C

## Analizės metodo tinkamumas

Pasverta dirvožemio	g	
Sauso dirvožemio masė	g	
CaCl <sub>2</sub> tirpalo tūris	cm <sup>3</sup>	
Galutinio tirpalo vardinė koncentracija	µg cm <sup>3</sup>	
Galutinio tirpalo analizinė koncentracija	µg cm <sup>3</sup>	

Taikyto analizės metodo esmė:

Analizės metodo kalibravimas:

Bandyta medžiaga:

Bandytas dirvožemis:

Sauso dirvožemio masės dalis (105 °C, 12h): ..... %

Temperatūra: ..... °C

Taikytas analizės metodas:      Netiesioginis            Lygiagretusis            Nuoseklusis        
    Tiesioginis     

## Adsorbcijos bandymas. Bandiniai

	Simbolis	Vienetai	Pusiausvyros nusistovėjimo laikas	Pusiausvyros nusistovėjimo laikas	Pusiausvyros nusistovėjimo laikas	Pusiausvyros nusistovėjimo laikas
Mėgintuvėlio Nr.						
Pasverta dirvožemio	—	g				
Sauso dirvožemio masė	m <sub>soil</sub>	g				
Vandens pasvertame dirvožemyje tūris (apskaičiuotas)	V <sub>WS</sub>	cm <sup>3</sup>				

	Simbolis	Vienetai	Pusiausvyros nusistovėjimo laikas		Pusiausvyros nusistovėjimo laikas		Pusiausvyros nusistovėjimo laikas		Pusiausvyros nusistovėjimo laikas	
0,01 M CaCl <sub>2</sub> tirpalo tūris pusiausvyrai su dirvožemiu pasiekti		cm <sup>3</sup>								
Pradinio tirpalo tūris		cm <sup>3</sup>								
Su dirvožemiu sąlytyje esančios vandeninės fazės bendras tūris	V <sub>0</sub>	cm <sup>3</sup>								
Bandomosios medžiagos tirpalo pradinė koncentracija	C <sub>0</sub>	µg cm <sup>-3</sup>								
Bandomosios medžiagos masė bandymo pradžioje	m <sub>0</sub>	µg								
<b>Po sumaišymo ir centrifugavimo</b>										
NETIESIOGINIS METODAS										
Lygiagretusis metodas										
Bandomosios medžiagos vandeninės fazės koncentracija, įskaitant tuščiojo bandymo pataisą	C <sub>aq</sub> <sup>ads</sup> (t <sub>i</sub> )	µg cm <sup>-3</sup>								
Nuoseklusis metodas										
Alikvotinės tirpalo dalies tūryje V <sub>a</sub> <sup>A</sup> išmatuota medžiagos masė	m <sub>m</sub> <sup>ads</sup> (t <sub>i</sub> )	µg								
NETIESIOGINIS METODAS										
Dirvožemiu adsorbuotos bandomosios medžiagos masė	m <sub>s</sub> <sup>ads</sup> (t <sub>i</sub> )	µg								
Adsorbcijos apskaičiavimas										
Adsorbcija	A <sub>t<sub>i</sub></sub>	%								
	A <sub>Δt<sub>i</sub></sub>	%								
Vidutinės vertės										
Adsorbcijos koeficientas	K <sub>d</sub>	cm <sup>3</sup> g <sup>-1</sup>								
Vidutinės vertės										
Adsorbcijos koeficientas	K <sub>oc</sub>	cm <sup>3</sup> g <sup>-1</sup>								
Vidutinės vertės										

Bandyta medžiaga:

Bandytas dirvožemis:

Sauso dirvožemio masės dalis (105 °C, 12h): ..... %

Temperatūra: ..... °C

## Adsorbcijos bandymas: tuštieji ir kontroliniai bandymai

	Simbolis	Vienetai	Tuščiasis bandymas		Tuščiasis bandymas		Kontrolinis bandymas	
Mėgintuvėlio Nr.								
Pasverta dirvožemio		g					0	0
Vandens pasvertame dirvožemyje tūris (apskaičiuotas)		cm <sup>3</sup>					—	—
Įpildo 0,01 M CaCl <sub>2</sub> tirpalo tūris		cm <sup>3</sup>						
Įpiltas bandomosios medžiagos pradinio tirpalo tūris		cm <sup>3</sup>	0	0				
Bendras vandeninės fazės tūris (apskaičiuotas)		cm <sup>3</sup>					—	—
Pradinė bandomosios medžiagos vandeninės fazės koncentracija		µg cm <sup>-3</sup>						
<b>Po sumaišymo ir centrifugavimo</b>								
Vandeninės fazės koncentracija		µg cm <sup>-3</sup>						

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 <sub>soil</sub>	g				
Vandens pasvertame dirvožemyje tūris (apskaičiuotas)	V <sub>ws</sub>	ml				
0,01 M CaCl <sub>2</sub> tirpalo tūris pusiausvyrai su dirvožemiu pasiekti		ml				
Pradinio tirpalo tūris		cm <sup>3</sup>				
Su dirvožemiu sąlytyje esančios vandeninės fazės bendras tūris	V <sub>0</sub>	cm <sup>3</sup>				
Bandomosios medžiagos tirpalo pradinė koncentracija	C <sub>0</sub>	µg cm <sup>-3</sup>				
Pusiausvyros nusistovėjimo trukmė	—	h				

## Po sumaišymo ir centrifugavimo

Bandomosios medžiagos vandeninės fazės koncentracija, iskaitant tuščiojo bandymo pataisą	$C_{aq}^{ads}(eq)$	$\mu\text{g cm}^{-3}$				
Pusiausvyros nusistovėjimo trukmė	$t_{eq}$	h				
1-asis praskiedimas tirpikliu						
Nupiltos vandeninės fazės tūris	$V_{rec}$	$\text{cm}^3$				
Įpilo tirpiklio tūris	$\Delta V$	$\text{cm}^3$				
1-asis ekstrahavimas tirpikliu						
Tirpiklio fazėje analizuojamos medžiagos signalas	$S_{E1}$	var.				
Tirpiklyje ištirpusios bandomosios medžiagos koncentracija	$C_{E1}$	$\mu\text{g cm}^{-3}$				
Medžiagos, ekstrahuotos iš dirvožemio ir nuo indo sienelių, masė	$m_{E1}$	$\mu\text{g}$				
2-asis praskiedimas tirpikliu						
Nupiltos tirpiklio tūris	$\Delta V_s$	$\text{cm}^3$				
Įpilo tirpiklio tūris	$\Delta V'$	$\text{cm}^3$				
2-asis ekstrahavimas tirpikliu						
Tirpiklio fazėje analizuojamos medžiagos signalas	$S_{E2}$	var.				
Tirpiklyje ištirpusios bandomosios medžiagos koncentracija	$C_{E2}$	$\mu\text{g cm}^{-3}$				
Medžiagos, ekstrahuotos iš dirvožemio ir nuo indo sienelių, masė	$m_{E2}$	$\mu\text{g}$				
Per dvi pakopas ekstrahuotos bandomosios medžiagos bendra masė	$m_E$	$\mu\text{g}$				
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							

	Simbolis	Vienetai							
Vandens pasvertame dirvožemyje tūris (apskaičiuotas)	$V_{WS}$	$cm^3$							
0,01 M $CaCl_2$ tirpalo tūris pusiausvyrai su dirvožemiu pasiekti		$cm^3$							
Įpildo pradinio tirpalo tūris		$cm^3$							
Su dirvožemiu sąlytyje esančios vandeninės fazės bendras tūris (apskaičiuotas)	$V_0$	$cm^3$							
Tirpalo koncentracija	$C_0$	$\mu g/cm^3$							
Pusiausvyros nusistovėjimo trukmė	—	h							

**Po sumaišymo ir centrifugavimo**

Bandomosios medžiagos vandeninės fazės koncentracija, įskaitant tuščiojo bandymo pataisą	$C_{aq}^{ads}(eq)$	$\mu g/cm^3$							
Temperatūra		$^{\circ}C$							
Adsorbuotos medžiagos masė, tenkanti dirvožemio masės vienetui	$C_s^{ads}(eq)$	$\mu g/g^{-1}$							

Regresijos analizė:

$K_F^{ads}$  vertė:

l/n vertė:

Regresijos koeficientas  $r^2$ :

Bandyta medžiaga:

Bandytas dirvožemis:

Sauso dirvožemio masės dalis (105  $^{\circ}C$ , 12h): ... %

Temperatūra: ...  $^{\circ}C$

Taikytas analizės metodas:                      Netiesioginis                          Lygiagretusis                                            Nuoseklusis                     

**Desorbcijos bandymas**

	Simbolis	Vienetai	Laiko tarpas	Laiko tarpas	Laiko tarpas	Laiko tarpas
Mėgintuvėlio, gauto iš adsorbcijos pakopos tarpsnio, Nr.						
Adsorbcijos pusiausvyros sąlygomis dirvožemio adsorbuotos medžiagos masė	$m_s^{ads}(eq)$	$\mu g$				
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	$V_T$	$cm^3$			

	Simbolis	Vienetai	Laiko tarpas	Laiko tarpas	Laiko tarpas	Laiko tarpas
Bandomosios medžiagos, likusios po adsorbcijos pusiausvyros bandymo dėl nevisiško tūrio pakeitimo, masė	$m_{aq}^A$	µg				
<b>Desorbcijos kinetika</b>						
Laiko momentu $t_i$ nuo dirvožemio desorbuotos medžiagos išmatuota masė	$m_m^{des}(t_i)$	µg				
Tirpalo, paimto iš mėgintuvėlio (i) bandomajai medžiagai nustatyti, tūris	PM	$V_f^i$	cm <sup>3</sup>			
	SM	$V_a^D$	cm <sup>3</sup>			
Laiko momentu $t_i$ nuo dirvožemio desorbuotos medžiagos masė (apskaičiuota)	$m_{aq}^{des}(t_i)$	µg				
Per laiko tarpą $\Delta t_i$ nuo dirvožemio desorbuotos medžiagos masė (apskaičiuota)	$m_{aq}^{des}(\Delta t_i)$	µg				
<b>Desorbcijos procentinė dalis</b>						
Desorbcija laiko momentu $t_i$	$D_{t_i}$	%				
Desorbcija per laiko tarpą $\Delta t_i$	$D_{\Delta t_i}$	%				
Tiriamas desorbcijos koeficientas	$K_{des}$					

PM: lygiagretusis metodas

SM: nuoseklusis metodas



C.19. **ADSORBCIJOS KOEFICIENTO ( $K_{oc}$ ), NUSTATYMAS DIRVOŽEMYJE IR AKTYVIAJAME DUMBLE AUKŠTOS SKYRIMO GALIOS SKYŠČIŲ CHROMATOGRAFIJA (HPLC)**

1. **METODAS**

Šis metodas yra OECD TG121 (2001) kopija.

1.1. ĮVADAS

Medžiagų sorbciją dirvožemiu ar nuotekų dumblu gali apibūdinti parametrai, bandymais nustatyti taikant C.18 bandymo metodą. Svarbus parametras yra adsorbcijos koeficientas, kuris apibrėžiamas kaip medžiagos dirvožemyje/dumble koncentracijos ir medžiagos vandeninės fazės koncentracijos santykis adsorbcijos pusiausvyros sąlygomis. Adsorbcijos koeficientas, normalizuotas pagal dirvožemio organinės anglies kiekį,  $K_{oc}$  yra naudingas cheminės medžiagos ir dirvožemio bei nuotekų dumblu organinės medžiagos surišimo gebos rodiklis ir leidžia lyginti įvairias chemines medžiagas. Šis parametras gali būti įvertintas taikant koreliacijas su tirpumu vandenyje ir pasiskirstymo koeficientu (n-oktanolis/vanduo) (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7).

Pagal aprašytą šio bandymo metodą adsorbcijos dirvožemiu ir nuotekų dumblu koeficientui  $K_{oc}$  nustatyti taikomas HPLC (8). Įverčiai yra patikimesni nei gauti pagal QSAR (*Quantitative Structure-Activity Relationships* – kiekybiniai struktūros ir aktyvumo ryšiai) apskaičiavimus (9). Kaip vertinimo metodas, jis negali visiškai pakeisti įkrovos pusiausvyros bandymų, atliekamų pagal C.18 bandymo metodą. Tačiau įvertintas  $K_{oc}$  gali būti naudingas tinkamiems bandymų parametrams pasirinkti adsorbcijai/desorbcijai tirti pagal C.18 bandymo metodą apskaičiuojant  $K_d$  (pasiskirstymo koeficientą) ar  $K_f$  (Freundlichio adsorbcijos koeficientą) pagal 3 lygtį (žr. 1.2 skirsnį).

1.2. APIBRĖŽTYS

$K_D$  – pasiskirstymo koeficientas, apibrėžiamas kaip dviejų fazių sistemoje, sudarytoje iš sorbento (dirvožemio ar nuotekų dumblu) ir vandeninės fazės, ištirpintos bandomosios medžiagos pusiausvyros koncentracijos  $C$  santykis; jis yra bematis dydis, jei abiejų fazių koncentracija išreikšta masės/masės koncentracija. Jei vandeninės fazės koncentracija išreikšta masės/tūrio koncentracija, vienetas yra  $ml\ g^{-1}$ .  $K_d$  gali keistis keičiantis sorbento savybėms ir gali priklausyti nuo koncentracijos.

$$K_d = \left( \frac{C_{soil}}{C_{aq}} \right) \text{ or } \left( \frac{C_{sludge}}{C_{aq}} \right) \quad (1)$$

čia:

$C_{soil}$  = bandomosios medžiagos dirvožemyje koncentracija pusiausvyros sąlygomis ( $\mu g\ g^{-1}$ )

$C_{sludge}$  = bandomosios medžiagos dumble koncentracija pusiausvyros sąlygomis ( $\mu g\ g^{-1}$ )

$C_{aq}$  = bandomosios medžiagos vandeninės fazės koncentracija pusiausvyros sąlygomis ( $\mu g\ g^{-1}$ ,  $\mu g\ ml^{-1}$ ).

$K_f$  – Freundlichio adsorbcijos koeficientas, apibrėžiamas kaip bandomosios medžiagos dirvožemyje ar nuotekų dumble koncentracija ( $x/m$ ), kai vandeninės fazės pusiausvyros koncentracija  $C_{aq}$  lygi vienetai; vienetai yra  $\mu g\ g^{-1}$  sorbento. Vertė gali keistis keičiantis sorbento savybėms.

$$\log \left( \frac{x}{m} \right) = \log K_f + \left( \frac{1}{n} \right) \cdot \log C_{aq} \quad (2)$$

čia:

$x/m$  = kiekis  $x$  ( $\mu g$ ) 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 ( $\mu g\ ml^{-1}$ )

$$\text{Kai } C_{aq} = 1; \log K_f = \log \left( \frac{x}{m} \right)$$

$K_{oc}$  – pasiskirstymo koeficientas ( $K_d$ ) ar Freundlichio adsorbcijos koeficientas ( $K_f$ ), normalizuoti pagal sorbento organinės anglies kiekį ( $f_{oc}$ ); ypač nejoninių cheminių medžiagų atveju jis yra apytikris medžiagos ir sorbento adsorbcijos laipsnio rodiklis ir leidžia lyginti skirtingas chemines medžiagas. Pagal tai, kokios yra  $K_d$  ir  $K_f$  dimensijos,  $K_{oc}$  gali būti bematis arba jo vienetai yra  $ml\ g^{-1}$  ar  $\mu g\ g^{-1}$  organinės medžiagos.

$$K_{oc} = \left( \frac{(K_d)}{(foc)} \right) (\text{bedimensinis arba } \text{ml} \cdot \text{g}^{-1}) \text{ ar } \left( \frac{(K_f)}{(foc)} \right) (\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}) \quad (3)$$

$K_{oc}$  ir  $K_d$  santykis nėra visuomet tiesiškas, taigi įvairių dirvožemių  $K_{oc}$  vertės gali būti skirtingos, tačiau jų kintamumas yra daug mažesnis lyginant su  $K_d$  ar  $K_f$  verčių kintamumu.

Adsorbcijos koeficientas ( $K_{oc}$ ) nustatomas iš sulaikymo faktoriaus ( $k'$ ) naudojant pasirinktų etaloninių medžiagų log  $k'$  pagal log  $K_{oc}$  kalibracinį grafiką.

$$k = \left( \frac{(t_R - t_0)}{(t_0)} \right) \quad (4)$$

čia:

$t_R$  = bandomosios ir etaloninės medžiagos sulaikymo trukmė HPLC metodu (minutės),

$t_0$  = eliuento sulaikymo trukmė (*dead time*) HPLC metodu (minutės) (žr. 1.8.2 skirsnį).

$P_{ow}$  – pasiskirstymo koeficientas (n-oktanolis/vanduo), apibrėžiamas kaip medžiagos n – oktanolio tirpalo ir vandens tirpalo koncentracijos santykis; jis yra bematis dydis.

$$Pow = \left( \frac{(Coctanol)}{(Caq)} \right) (= Kow) \quad (5)$$

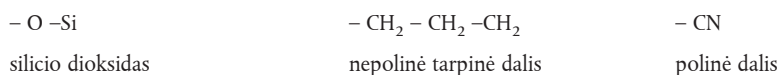
### 1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Prieš taikant metodą reikia žinoti struktūrinę formulę, grynumą ir disociacijos konstantą (jei tinka). Vertinga yra informacija apie tirpumą vandenyje ir organiniuose tirpikliuose, apie pasiskirstymo koeficientą (n-oktanolis/vanduo) ir apie hidrolizės charakteristikas.

Išmatuotiems bandomosios medžiagos HPLC sulaikymo duomenims ir jos adsorbcijos koeficientui  $K_{oc}$  susieti turi būti gauta log  $K_{oc}$  pagal log  $k$  kalibracinė kreivė. Turi būti panaudoti ne mažiau kaip šeši etaloniniai taškai, bent vienas jų žemiau laukiamos bandomosios medžiagos vertės ir vienas aukščiau šios vertės. Metodo tikslumas labai padidėja, jei naudojamos etaloninės medžiagos struktūra yra panaši į bandomosios medžiagos. Jei tokių duomenų nėra, vartotojas gali pats pasirinkti atitinkamas kalibravimo medžiagas. Tokiu atveju reikėtų pasirinkti bendresnį rinkinį struktūriškai nevienalyčių medžiagų. Rekomenduojamos naudoti medžiagos ir nuotekų dumblo  $K_{oc}$  vertės yra pateiktos 1 priedėlio 1 lentelėje ir dirvožemio – 3 lentelėje. Kitų kalibravimo medžiagų pasirinkimą būtina pagrįsti.

### 1.4. BANDYMO METODO PRINCIPAS

Bandymas HPLC metodu atliekamas analizės kolonėlėse, kurių kietąją fazę sudaro pramoninės gamybos cianpropilo kietoji fazė, turinti lipofilines ir polines dalis. Naudojama vidutinio poliškumo nejudama fazė, nešiklis – silicio dioksidas:



Bandymo metodo principas yra panašus į A.8 bandymo metodo (pasiskirstymo koeficientas, HPLC metodas) principą. Bandomajai medžiagai einant per kolonėlę kartu su judamąja faze, vyksta medžiagos ir nejudamosios fazės sąveika. Dėl pasidalijimo tarp judamosios ir nejudamosios fazių bandomoji medžiaga sulaikoma. Kadangi nejudamoji fazė susideda iš polinės ir nepolinės dalies, vyksta jos sąveika su molekulinėmis ir nepolinėmis grupėmis, panašiai kaip ant organinės medžiagos, kurios nešiklis yra dirvožemis ar nuotekų valymo dumblas. Taip galima nustatyti santykį tarp kolonėlės sulaikymo trukmės ir adsorbcijos ant organinės medžiagos koeficiento.

Didelę įtaką sorbcijai turi pH vertė, ypač polinių medžiagų sorbcijai. Žemės ūkio paskirties dirvožemio ar nuotekų valymo įrenginių talpyklų pH paprastai yra 5,5–7,5. Jei medžiagos gali jonizuotis, naudojant tinkamus buferinius tirpalus turi būti atliekami du bandymai medžiagai esant joninio ir nejoninio pavidalo, tačiau tik tais atvejais, kai bandomosios medžiagos disociacijos laipsnis pH 5,5–7,5 intervale yra bent 10 %.

Kadangi vertinimui naudojamas santykis tarp HPLC kolonėlės sulaikymo trukmės ir adsorbcijos koeficiento, nereikia jokio kiekybinio analizės metodo, būtina nustatyti tik sulaikymo trukmę. Jei yra tinkamas etaloninių medžiagų rinkinys ir galima naudoti standartinės bandymo sąlygas, metodas leidžia greitai ir veiksmingai įvertinti adsorbcijos koeficientą  $K_{oc}$ .

#### 1.5. METODO TAIKOMUMAS

HPLC metodas taikomas cheminėms medžiagoms (nežymėtoms ar su žymėtaisiais atomais), kurioms galima pritaikyti tinkamą aptikimo sistemą (pvz., spektrofotometrą, radioaktyvumo detektorių) ir kurios yra gana stabilios vykstant bandymui. Jis gali būti ypač naudingas cheminėms medžiagoms, sunkiai tiriamoms kitomis bandymo sistemomis (t. y. lakioms medžiagoms; medžiagoms, kurios tirpsta esant mažesnei nei analiziškai nustatoma koncentracija; medžiagoms, kurių 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.

Kartais priemonės gali trukdyti aiškinant HPLC rezultatus, tačiau jos nėra tokios svarbios, jei bandomoji medžiaga gali būti aiškiai identifikuota analiziškai ir atskirta nuo priemonių.

Metodas patikrintas naudojant medžiagas, išvardytas priedėlio 1 lentelėje, taip pat juo buvo tiriamos įvairios šių klasių medžiagos:

- aromatiniai aminorai (pvz., trifluralinas, 4-chloranilinas, 3,5-dinitroanilinas, 4-metilanilinas, N-metilanilinas, 1-naftilaminas),
- aromatinių karboksilinių rūgščių esteriai (pvz., benzenkarboninės rūgšties metilesteris, 3,5-dinitrobenzenkarboninės rūgšties etilesteris),
- aromatiniai angliavandeniliai (pvz., toluenas, ksilenas, etilbenzenas, nitrobenzenas),
- ariloksifenoksi-propioninės rūgšties esteriai (pvz., diklofopmetilas, fenoksapropetilas, fenoksaprop-P-etilas),
- fungicidai benzimidazolo ir imidazolo pagrindu (pvz., karbendazimas, fuberidazolas, triazoksidas),
- karboksilinių 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 eliuentu ar su nejudamąja faze. Jis taip pat netinka medžiagoms, kurios su neorganiniais komponentais reaguoja specifiniu būdu (pvz., su molio mineralais sudaro klasterinius kompleksinius junginius). Metodas gali netikti paviršiaus veikliosioms medžiagoms, neorganiniams junginiams ir vidutinio stiprumo ar stiprioms organinėms rūgštims ir bazėms. Galima nustatyti  $\log K_{oc}$  vertes

1,5–5,0 intervale. Jonizuojamos medžiagos turi būti matuojamos naudojant buferinę judamąją fazę, tačiau reikia žiūrėti, kad nesusidarytų buferinio tirpalo komponentų ar bandomosios medžiagos nuosėdų.

## 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 sukaupta patirtis taikant metodą patvirtina jo tinkamumą. Tiriant HPLC metodą pagal 48 medžiagas (daugiausia pesticidus), apie kurias yra patikimų adsorbcijos dirvožemiu  $K_{oc}$  duomenų, gautas koreliacijos koeficientas  $R = 0,95$  (10) (11).

Metodui tobulinti ir jo tinkamumui patvirtinti buvo atliekamas tarplaboratorinio palyginimo bandymas dalyvaujant 11 laboratorijų (12). Rezultatai pateikti priedėlio 2 lentelėje.

## 1.7. BANDYMO METODO APRAŠYMAS

### 1.7.1. Adsorbcijos koeficiento pradinis įvertinimas

Adsorbcijos laipsnio rodikliu, ypač nejonizuotų medžiagų atveju, gali būti naudojamas pasiskirstymo koeficientas (n-oktanolis/vanduo)  $P_{ow}$  (=  $K_{ow}$ ) ir tam tikru laipsniu tirpumas vandenyje, taigi jie gali būti naudojami pradiniam intervalui nustatyti. Kelioms cheminių medžiagų grupėms buvo paskelbta nemažai naudingų koreliacijų (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7).

### 1.7.2. Aparatūra

Būtina turėti skysčių chromatografą su nepulsuojančiu siurbliu ir atitinkamu aptikimo įtaisu. Rekomenduojama naudoti injekcijos vožtuvą ir injekcijos kilpą. Naudojamos pramoninės gamybos cianpropilo dervos, chemiškai surištos su silicio dioksido nešikliu (pvz., Hypersil ir Zorbax CN). Tarp injekcijos sistemos ir analizės kolonėlės galima įtaisyti tos pačios medžiagos apsauginę kolonėlę. Skirtingų tiekėjų kolonėlių skiriamoji galia gali labai skirtis. Vadovautis reikėtų šiomis sulaikymo faktorių  $k'$  vertėmis: log  $k' > 0,0$ , jei log  $K_{oc} = 3,0$ , ir log  $k' > 0,4$ , jei log  $K_{oc} = 2,0$ , jei judamąja faze naudojamas metanolio/vandens 55/45 % mišinys.

### 1.7.3. Judamosios fazės

Buvo bandytos kelios judamosios fazės, rekomenduoti galima šias dvi:

- metanolio/vandens (55/45 % v/v) mišinį,
- metanolio/0,01 M citratinio buferio pH 6,0 (55/45 % v/v) mišinį.

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 atliekami atskirose kolonėlėse.

#### 1.7.4. **Tirpiniai**

Bandomoji ir etaloninė medžiagos turi būti ištirpintos judamojoje fazėje.

### 1.8. BANDYMO PROCEDŪRA

#### 1.8.1. **Bandymo sąlygos**

Darant matavimus turi būti registruojama temperatūra. Sąlygų pastovumui užtikrinti labai rekomenduojama kolonėlę laikyti termostatuojamoje kameroje, kai daromi kalibravimo, vertinimo ir bandomosios medžiagos matavimai.

#### 1.8.2. **Eliuento sulaikymo trukmės $t_0$ 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.

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 etalonių medžiagų  $t_R$  taikant 4 lygtį apskaičiuojami sulaikymo faktoriai  $k'$  (žr. 1.2 skirsnį). Etalonių 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 etalonių medžiagas.

## 2. **DUOMENYS IR ATASKAITA**

Ataskaitoje turi būti pateikta ši informacija:

- bandomosios ir etaloninės medžiagos identifikavimas bei jų grynumas ir, jei tinka,  $pK_a$  vertės,
- įrangos ir darbo sąlygų aprašymas, pvz., analizės (ir apsauginės) kolonėlės tipas bei matmenys, aptikimo būdas, judamoji fazė (komponentų santykis ir pH), bandymų temperatūros intervalas,

- eliuento sulaikymo trukmė ir jos nustatymo metodas,
- į kolonėlę išvirkštos 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.
- 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.

## Priedėlis

## 1 lentelė

Dirvožemių ir nuotekų dumblių  $K_{oc}$  verčių ir HPLC atrankos metodu apskaičiuotų verčių palyginimas <sup>(1)</sup>, <sup>(2)</sup>

Medžiaga	CAS Nr.	Nuotekų dumblo $\log K_{oc}$	$\log K_{oc}$ HPLC	A	Dirvo žemių $\log K_{oc}$	$\log K_{oc}$ HPLC	A
Atrazinas	1912-24-9	1,66	2,14	0,48	1,81	2,20	0,39
Linuronas	330-55-2	2,43	2,96	0,53	2,59	2,89	0,30
Fentionas	55-38-9	3,75	3,58	0,17	3,31	3,40	0,09
Monuronas	150-68-5	1,46	2,21	0,75	1,99	2,26	0,27
Fenantrenas	85-01-8	4,35	3,72	0,63	4,09	3,52	0,57
Benzoinės rūgšties fenilesteris	93-99-2	3,26	3,03	0,23	2,87	2,94	0,07
Benzamidas	55-21-0	1,60	1,00	0,60	1,26	1,25	0,01
4-nitrobenzamidas	619-80-7	1,52	1,49	0,03	1,93	1,66	0,27
Acetanilidas	103-84-4	1,52	1,53	0,01	1,26	1,69	0,08
Anilinas	62-53-3	1,74	1,47	0,27	2,07	1,64	0,43
2,5-dichloranilinas	95-82-9	2,45	2,59	0,14	2,55	2,58	0,03

<sup>(1)</sup> 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.

<sup>(2)</sup> W. Kördel, D. Hennecke, C. Franke (1997). Determination of the adsorption-coefficients of organic substances on sewage sludges. Chemosphere, 35 (1/2), 107-119.

## 2 lentelė

Tarplaboratorinio palyginimo bandymo (11 dalyvaujančių laboratorijų), atlikto HPLC metodui patobulinti ir tinkamumui patvirtinti, rezultatai <sup>(1)</sup>

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

<sup>(1)</sup> 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, pagrįstam duomenimis apie adsorbciją dirvožemiu

Etaloninė medžiaga	CAS-Nr.	log $K_{oc}$ vidutinės vertės pagal įkrovos pusiausvyrą	$K_{oc}$ duomenų skaičius	log S.D.	Šaltinis
Acetanilidas	103-84-4	1,25	4	0,48	(a)
Fenolis	108-95-2	1,32	4	0,70	(a)
2-Nitrobenzamidai	610-15-1	1,45	3	0,90	(b)
N, N-dimetilbenzamidai	611-74-5	1,52	2	0,45	(a)
4-Metilbenzamidai	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 -Nitrobenzamidai	645-09-0	1,95	3	1,31	(b)
Anilinas	62-53-3	2,07	4	1,73	(a)
3,5-Dinitrobenzamidai	121-81-3	2,31	3	1,27	(b)
Karbendazimas	10605-21-	2,35	3	1,37	(c)
Triadimenolis	55219-65-3	2,40	3	1,85	(c)
Triazoksidas	72459-58-6	2,44	3	1,66	(c)
Triazofosas	24017-47- 4017-47-8	2,55	3	1,78	(c)
Linuronas	330-55-2	2,59	3	1,97	(c)
Naftalenas	91-20-3	2,75	4	2,20	(a)
Endosulfandiolis	2157-19-9	3,02	5	2,29	(c)
Metiokarbas	2032-65-7	3,10	4	2,39	(c)
Rūgštusis geltonas 219	63405-85-6	3,16	4	2,83	(a)
1,2,3-trichlorobenzenas	87-61-6	3,16	4	1,40	(a)
y-HCH	58-89-9	3,23	5	2,94	(a)
Fentionas	55-38-9	3,31	3	2,49	(c)
Tiesioginis raudonasis 81	2610-11-9	3,43	4	2,68	(a)
Pirazofosas	13457-18-6	3,65	3	2,70	(c)
α-Endosulfanas	959-98-8	4,09	5	3,74	(c)
Dichlofopmetilas	51338-27-3	4,20	3	3,77	(c)
Fenantrenas	85-01-8	4,09	4	3,83	(a)
Bazinis mėlynasis 41 (mišinys)	26850-47-5 12270-13-2	4,89	4	4,46	(a)
DDT	50-29-3	5,63		—	(b)

(a) W. Kördel, J. Müller (1994). Bestimmung des Adsorptionskoeffizienten organischer Chemikalien mit der HPLC. UBA R & D Report No. 106 01 044 (1994).

(b) B.V. Oepen, W. Kördel, W. Klein. (1991). Chemosphere, 22, 285-304

(c) Pramonės pateikti duomenys.



## C.20 DAPHNIA MAGNA REPRODUKCIJOS BANDYMAS

## 1. METODAS

Šis toksiškumo reprodukcijai bandymo metodas yra OECD TG 211 (1998) kopija.

## 1.1. ĮVADAS

Pagrindinis šio bandymo tikslas – įvertinti cheminių medžiagų poveikį *Daphnia magna* reprodukcijos našumui.

## 1.2. APIBRĖŽTYS IR VIENETAI

**Motininiai gyvūnai** – nuo bandymo pradžios naudojamos moteriškos lyties dafnijos, kurių yra tiriamas reprodukcijos našumas.

**Palikuonys** – atliekant bandymą atvestos dafnijos.

**Mažiausia pastebimą poveikį sukelianti koncentracija (LOEC)** – mažiausia bandomosios medžiagos koncentracija, kuriai esant medžiaga per nustatytą veikimo laikotarpį daro statistiškai reikšmingą poveikį, lyginant su kontroliniais bandiniais, reprodukcijai ir motininių gyvūnų gaištamumui ( $p < 0,05$ ). Tačiau visų didesnių kaip LOEC bandomųjų koncentracijų kenksmingas poveikis turi būti lygus ar didesnis kaip LOEC koncentracijos bandomosios medžiagos poveikis. Jei šios dvi sąlygos negali būti įvykdytos, turi būti pateiktas išsamus paaiškinimas, kodėl buvo pasirinkta LOEC (taigi ir NOEC).

**Nepastebėto poveikio koncentracija (NOEC)** – bandomoji koncentracija bent kiek mažesnė už LOEC, kuri per nustatytą veikimo laikotarpį nedaro statistiškai reikšmingo poveikio ( $p < 0,05$ ) lyginant su kontroliniais bandiniais.

**EC<sub>x</sub>** – vandenyje ištirpintos bandomosios medžiagos koncentracija, kuriai esant *Daphnia magna* reprodukcija per nustatytą veikimo laikotarpį sumažėja x %.

**Būdingasis praeaugio greitis** – populiacijos augimo matas, apimantis reprodukcijos našumą ir amžiui būdingą gaištamumą (20) (21) (22). Stacionarios būsenos populiacijų būdingasis praeaugio greitis lygus nuliui. Augančių populiacijų greitis yra teigiamas, o nykstančių populiacijų – neigiamas. Aišku, kad pastarosios yra neilgaamžės ir galiausiai išnyksta.

**Aptikimo riba** – mažiausia koncentracija, kai medžiagą galima aptikti, bet nenumatyti kiekybiškai.

**Nustatymo riba** – mažiausia kiekybiškai nustatoma koncentracija.

**Gaištamumas** – gyvūnas registruojamas nugaišęs, kai jis nejudą, t. y. kai negali plaukti arba kai, 15 s lengvai papurčius bandymo indą, nepastebima judant galūnių ar pilvelio. (Jei taikoma kitas apibrėžtis, ji turi būti pateikta kartu su nuoroda.)

## 1.3. BANDYMO METODO PRINCIPAS

Jaunos moteriškos lyties dafnijos (motininiai gyvūnai), kurių amžius bandymo pradžioje mažesnis kaip 24 h, yra veikiamos bandomąja medžiaga, ištirpinta vandenyje tam tikram koncentracijos verčių intervalui gauti. Bandymo trukmė 21 para. Baigiant bandymą įvertinamas vienam gyvam motininiam gyvūnui tenkančių gyvų palikuonių bendras skaičius. Suaugusiųjų atvesti jaunikliai, kurie žūva atliekant bandymą, į skaičiavimus neįtraukiami. Motininių gyvūnų reprodukcijos našumą galima išreikšti kitais būdais (pvz., gyvų palikuonių, atvestų vieno gyvūno per parą nuo pirmos palikuonių pastebėjimo dienos, skaičiumi), tačiau ataskaitoje šie skaičiai turi būti pateikiami papildomai prie bendro gyvų jauniklių skaičiaus, bandymo pabaigoje tenkančio vienam motininiam gyvūnui. Mažiausiai pastebimą poveikį sukeliančiai koncentracijai (LOEC), kartu ir nepastebėto poveikio koncentracijai, nustatyti (NOEC) bandomąja medžiaga veikiamų gyvūnų reprodukcijos našumas lyginamas su kontrolinio (-ių) bandinio (-ių) našumu. Be to, duomenys analizuojami taikant, kiek įmanoma, regresijos modelį, kad būtų galima įvertinti koncentraciją, kuriai esant reprodukcijos našumas sumažėtų x % (t. y. the EC<sub>50</sub>, EC<sub>20</sub>, ar EC<sub>10</sub>).

Ataskaitoje taip pat turi būti nurodytas motininių gyvūnų išlikimo laipsnis ir pirmosios vados atsiradimo laikas. Gali būti ištirti kiti medžiagos veikiami parametrai, pvz., augimas (pvz., ilgis) ir galbūt būdingasis prieaugio greitis.

#### 1.4. INFORMACIJA APIE BANDOMĄJĄ MEDŽIAGĄ

Reikėtų turėti su *Daphnia magna* atlikto trumpalaikio toksiškumo bandymo (žr. C.2 metodo I dalį) rezultatus. Rezultatas gali būti naudingas pasirenkant atitinkamą reprodukcijos bandymų bandomosios koncentracijos intervalą. Turi būti žinomas bandomosios medžiagos tirpumas vandenyje ir garų slėgis, be to, bandomosios medžiagos tirpalų koncentracijai kiekybiškai nustatyti turi būti prieinamas patikimas analizės metodas, kurio žinomi regeneravimo efektyvumas ir nustatymo riba.

Informacija apie bandomąją medžiagą, galinti būti vertinga nustatant bandymo sąlygas, apima struktūrinę formulę, medžiagos grynumą, stabilumą šviesoje, stabilumą bandymo sąlygomis, pKa, P<sub>ow</sub> ir lengvo biologinio skaidumo bandymo rezultatus (žr. C.4 metodą).

#### 1.5. BANDYMO TINKAMUMAS

Metodas yra tinkamas, jei, atliekant kontrolinį (-ius) bandymą (-us), įvykdomi šie veiksmingumo kriterijai:

- bandymo pabaigoje motininių gyvūnų gaištamumas (moteriškos lyties dafnijų) yra ne didesnis kaip 20 %,
- iš vieno iki bandymo pabaigos išgyvenusio motininio gyvūno gautų gyvų palikuonių vidutinis skaičius yra  $\geq 60$ .

#### 1.6. BANDYMO METODO APRAŠYMAS

##### 1.6.1. Aparatūra

Bandymo indai ir kita aparatūra, su kuria liečiasi bandomieji tirpalai, turi būti pagaminti vien tik iš stiklo ar kitos chemiškai inertiškos medžiagos. Bandymams paprastai naudojamos laboratorinės stiklinės.

Be to, yra reikalinga ši aparatūra arba jos dalis:

- deguonies matuoklis (su mikroelektrodu ar kita tinkama įranga ištirpusiam deguoniui mažo tūrio bandiniuose matuoti),
- atitinkama aparatūra pastoviai temperatūrai palaikyti,
- pH-metras,
- įranga vandens kietumui nustatyti,
- įranga bendrosios organinės anglies vandenyje koncentracijai (TOC) ar įranga cheminiam deguonies suvaržymui (COD) nustatyti,
- tinkama aparatūra apšvietimo režimui kontroliuoti ir šviesos intensyvumui matuoti.

##### 1.6.2. Bandomieji organizmai

Bandymui reikėtų naudoti *Daphnia magna Straus*. Galima naudoti kitas dafnijų rūšis, jei jos atitinka nustatytus tinkamumo kriterijus (dafnijų rūšiai turi būti taikomas su kontrolinių bandinių reprodukcijos našumu susijęs tinkamumo kriterijus). Jei naudojamos kitos dafnijų rūšys, jos turi būti aiškiai apibrėžtos ir jų naudojimas turi būti pagrįstas.

Kloną geriau būtų identifikuoti pagal genotipą. Tyrimas (1) parodė, kad A klonas (jo kilmė – IRCHA (*Institut de Recherche en Chimie Appliquée*), Prancūzija) (3) reprodukcijos našumas visą laiką atitinka tinkamumo kriterijų, pagal kurį vieno motininio gyvūno, išlikusio gyvo auginant šiame metode aprašytomis sąlygomis, vidutinis palikuonių skaičius  $\geq 60$ . Tačiau priimtini ir kiti klonai, jei parodoma, kad dafnijų kultūra atitinka bandymo tinkamumo kriterijus.

Bandymo pradžioje gyvūnai turi būti jaunesni kaip 24 h ir neturi būti pirmoji palikuonių karta. Jie turi būti gauti iš sveikų motininųjų gyvūnų (t. y. be streso požymių, pvz., didelis gaištamumas, vyriškos lyties atstovų ir *ephippia* buvimas, vėlavimas atvesti pirmąją vadą, pasikeitusi gyvūnų spalva ir t. t.). Motininiai gyvūnai turi būti laikomi tokiomis sąlygomis (šviesa, temperatūra, terpė, maitinimas ir gyvūnų skaičius tūrio vienetai), kurios būtų panašios į bandymo sąlygas. Jei bandymui naudota auginimo terpė skiriasi nuo įprastos dafnijų auginimo terpės, motininųjų gyvūnų stresui išvengti gera praktika reikalauja leisti dafnijoms paprastai maždaug per tris savaites (t. y. vienos kartos laikotarpiu) aklimatizuotis.

#### 1.6.3. Bandomoji terpė

Rekomenduojama šiems bandymams naudoti visiškai apibrėžtą terpę. Taip galima išvengti sunkiai apibūdinamų priedų naudojimo (pvz., jūros dumblių, dirvožemio ekstrakto ir t. t.), taigi pagerėja tarplaboratorinio standartizavimo galimybės. Buvo nustatyta, kad geriausiai tinka Elenđt M4 (4) ir M7 terpės (žr. 1 priedėlį). Tačiau yra priimtinos ir kitos terpės (pvz., (5) (6)), jei jose išauginta dafnijų kultūra atitinka bandymui nustatytus tinkamumo kriterijus.

Jei naudojamos terpės su neapibrėžtais priedais, šie priedai turi būti aiškiai apibūdinti ir bandymo ataskaitoje turi būti informacija apie jų sudėtį, ypač apie organinės anglies kiekį, nes ji gali būti tiekiamo maisto dalis. Rekomenduojama nustatyti organinio priedo pradinio tirpalo bendrąją organinę anglį (TOC) ir (ar) cheminį deguonies suvartojimą (COD) ir įvertinti dėl jų paruoštoje terpėje susidarantį TOC/COD. Rekomenduojama, kad terpės (t. y. prieš pridėdant dumblių) TOC lygis būtų mažesnis kaip 2 mg/l (7).

Bandant metalų turinčias medžiagas, svarbu suprasti, kad bandomosios terpės savybės (pvz., kietumas, chelatavimo geba) gali turėti įtakos bandomosios medžiagos toksiškumui. Dėl šios priežasties pageidautina turėti visiškai apibrėžtą terpę. Tačiau vienintelės visiškai apibrėžtos terpės, kurios, kiek šiandien žinoma, tiktų ilgą laiką auginti *Daphnia magna*, yra Elenđt M4 ir M7. Abiejose terpėse esama chelatavimo medžiagos EDTA. Darbas (2) parodė, kad reprodukcijos bandymą atliekant M4 ir M7 terpėje, kadmio „tariamasis toksiškumas“ paprastai yra mažesnis lyginant su EDTA neturinčia terpe. Taigi M4 ir M7 nerekomenduojama naudoti bandant metalų turinčias medžiagas, taip pat reikėtų vengti naudoti terpes, turinčias žinomas chelatavimo medžiagas. Metalų turinčioms medžiagoms patartina naudoti kitą terpę, pvz., ASTM (*American Society for Testing and Materials*) atkurtoji kietą gelą vandenį (7) be EDTA, į kurį pridėta jūros dumblių ekstrakto (8). Šis ASTM atkurtojo kieto gėlo vandens ir jūros dumblių ekstrakto derinys taip pat tinka ilgą laiką auginti ir bandyti *Daphnia magna* (2), nors dėl jūros dumblių ekstrakto organinio komponento vis dar pasireiškia nedidelis chelatuojantis veikimas.

Bandymo pradžioje ir toliau per visą bandymą ištirpusio deguonies koncentracija turi būti didesnė kaip 3 mg/l. pH vertė turi būti 6–9 ir atliekant bet kurį bandymą ji paprastai neturi kisti daugiau kaip 1,5 vieneto. Rekomenduojamas 140 mg/l (pagal CaCO<sub>3</sub>) kietumas. Bandymai, atlikti esant šiam ar aukštesniam lygiui, parodė, kad reprodukcijos našumas atitinka tinkamumo kriterijus (9) (10).

#### 1.6.4. Bandomieji tirpalai

Pasirinktos koncentracijos bandomieji tirpalai paprastai ruošiami skiedžiant pradinį tirpalą. Pradinius tirpalus geriau ruošti tirpinant medžiagą bandomojoje terpėje.

Kartais, norint gauti tinkamos koncentracijos pradinį tirpalą, gali tekti naudoti organinius tirpiklius ar dispergatorius, tačiau reikia kiek įmanoma stengtis šių medžiagų nenaudoti. Tinkami tirpikliai yra acetonas, etanolis, metanolis, dimetilformamidas ir trietilenglikolis. Tinkami dispergatoriai yra *Cremophor* RH40, 0,01 % metilceliuliozė ir HCO-40. Bet kuriuo atveju bandomosios medžiagos bandomojo tirpalo koncentracija neturi būti didesnė kaip tirpumo bandomojoje terpėje riba.

Tirpikliai naudojami pradiniam tirpalui ruošti, kuris gali būti tiksliai dozuojamas vandeniu. Kai pirmiau išvardyti tirpikliai galutinėje bandomojoje terpėje bus rekomenduojamos koncentracijos (t. y.  $\leq 0,1$  ml/l), jie nebus toksiški ir nepadidins medžiagos tirpumo vandenyje.

Dispergatoriai gali padėti tiksliai dozuoti ir disperguoti. Kai pirmiau išvardyti dispergatoriai galutinėje bandomojoje terpėje bus rekomenduojamos koncentracijos ( $\leq 0,1$  ml/l), jie nebus toksiški ir nepadidins medžiagos tirpumo vandenyje.

## 1.7. BANDYMO SCHEMA

Bandymo indai paskirstomi pagal apdorojimo būdus, o toliau visi bandymo indai turi būti tvarkomi atsitiktiniu būdu. Taip nedarant, gali atsirasti nukrypimas, kuris galėtų būti aiškinamas koncentracijos poveikiu. Ypač jei bandymo vienetai tvarkomi tokia seka, kokia jie buvo apdoroti, arba atsižvelgiant į koncentraciją, kai kurie su laiku susiję veiksniai, pvz., operatoriaus nuovargis ar kita klaida esant didesnėms koncentracijos vertėms gali turėti rimtesnių padarinių. Be to, jei bandymo rezultatus gali veikti bandymo pradinės ar aplinkos, pvz., padėties laboratorijoje, sąlygos, reikėtų svarstyti blokinę bandymo schemą.

## 1.8. BANDYMO PROCEDŪRA

## 1.8.1. Veikimo sąlygos

## 1.8.1.1. Trukmė

Bandymo trukmė – 21 para.

## 1.8.1.2. Įkrova

Motininiai gyvūnai laikomi atskirai po vieną bandymo inde su 50–100 ml terpės.

Kartais, atsižvelgiant į analizės metodikos bandomajai medžiagai nustatyti reikalavimus, gali būti reikalingas didesnis tūris, nors cheminei analizei atlikti leidžiama kartu supilti tos pačios koncentracijos bandinius. Jei naudojamas didesnis kaip 100 ml tūris, gali tekti padidinti dafnijų maisto davinį, kad turimo maisto pakaktų ir būtų garantuota tinkamumo kriterijų atitiktis. Dinaminiais bandymams dėl techninių priežasčių galima numatyti alternatyvias bandymo schemas (pvz., keturias grupes po 10 gyvūnų didesniame bandymo tūryje), tačiau visi bandymo schemas pakeitimai turi būti nurodyti ataskaitoje.

## 1.8.1.3. Gyvūnų skaičius

Pusiau statiniams bandymams kiekvienai koncentracijai imama bent 10 atskirai laikomų gyvūnų ir bent 10 atskirai laikomų gyvūnų kontrolinės serijos bandiniams.

Buvo parodyta, kad dinaminiais bandymams kiekvienai koncentracijai tinka naudoti 40 gyvūnų, padalytų į keturias grupes po 10 gyvūnų (1). Galima naudoti mažiau bandomųjų organizmų, bet kiekvienai koncentracijai rekomenduojama naudoti ne mažiau kaip po 20 gyvūnų, padalytų į du ar daugiau bandinių su vienodu gyvūnų skaičiumi (pvz., į keturis bandinius su 5 dafnijomis kiekvienam bandiniui). Atkreiptinas dėmesys, kad, jei atliekant bandymus su grupėmis laikomais gyvūnais, motininiai gyvūnai žūva, reprodukcijos našumo bus neįmanoma išreikšti kaip bendro 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

Atliekant pusiau statinius bandymus geriau maitinti kasdien, tačiau ne mažiau kaip tris kartus per savaitę (tai atitinka terpės keitimą). Nukrypimai nuo šių sąlygų (pvz., dinaminių bandymų) nurodomi ataskaitoje.

Atliekant bandymą motininių gyvūnų maistą turėtų sudaryti šių gyvūnų dumblių ląstelės: *Chlorella sp.*, *Selenastrum capricornutum* (dabar *Pseudokirchneriella subcapitata* (11)) ir *Scenedesmus subspicatus*. Tiekiamas maistas turėtų būti apskaičiuotas pagal organinės anglies (C) kiekį, duodamą kiekvienam motininiam gyvūnui. Tyrimas (12) parodė, kad *Daphnia magna* pakanka gauti 0,1–0,2 mg C/dafnijai/parai, kad būtų pasiektas bandymo tinkamumo kriterijus, atitinkantis palikuonių skaičių. Maistą galima tiekti vienodai visą bandymo laiką ar, jei norima, mažiau bandymo pradžioje ir daugiau bandymo eigoje, atsižvelgiant į motininių gyvūnų augimą. Šiuo atveju visą laiką davyns turi atitikti rekomenduotą intervalą 0,1–0,2 mg C/dafnijai/parai.

Jei maitinimo lygiui nustatyti naudojami pakeitimo parametrai, pvz., dumblių ląstelių skaičius ar šviesos absorbcija (t. y. kad būtų patogiau, nes anglies kiekiui nustatyti reikia daug laiko), kiekviena laboratorija turi daryti savo nomogramą, kuri pakeitimo 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 bandymo indus pilamos kultūros terpės tūris būtų 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  $15\text{--}20 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ .

## 1.8.1.6. Temperatūra

Band terpės temperatūra turi būti  $18\text{--}22 \text{ }^\circ\text{C}$ . Tačiau, jei įmanoma, atliekant visus bandymus temperatūra neturėtų kisti daugiau kaip  $2 \text{ }^\circ\text{C}$  taikant šiuos intervalus (pvz.,  $18\text{--}20$ ,  $19\text{--}21$  ar  $20\text{--}22 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Temperatūrai kontroliuoti gali būti naudingas papildomas bandymo indas.

## 1.8.1.7. Aeravimas

Atliekant bandymą bandomieji tirpalai neaeruojami.

## 1.8.2. Bandomoji koncentracija

Paprastai naudojamos bent penkios bandomosios koncentracijos vertės, sudarančios geometrinę progresiją, kurios daugiklis būtų ne didesnis kaip 3,2, ir kiekvienai bandomosios koncentracijos vertei daromas atitinkamas skaičius lygiagrečiųjų bandymų (žr. 1.8.1.3 skirsnį). Jei naudojamos mažiau kaip penkios koncentracijos vertės, tai reikia pagrįsti. Neturi būti bandomos medžiagos, jei jų koncentracija yra didesnė nei tirpumo bandomojoje terpėje riba.

Nustatant koncentracijų intervalą būtina žinoti:

- i) jei tikslas – nustatyti LOEC/NOEC, mažiausia bandomoji koncentracija turi būti gana maža, kad ją naudojant vaisingumas lyginant su kontroliniu bandiniu nebūtų pastebimai mažesnis. Jei taip nėra, bandymą reikia pakartoti su dar mažesne mažiausia koncentracija;
- ii) jei tikslas – nustatyti LOEC/NOEC, didžiausia bandomoji koncentracija turi būti gana didelė, kad ją naudojant vaisingumas lyginant su kontroliniu bandiniu būtų daug mažesnis. Jei taip nėra, bandymą reikia pakartoti su dar didesne didžiausia koncentracija;
- iii) jei vertinama reprodukciją veikianti  $EC_x$ , jai apibrėžti atitinkamu pasiklivimo 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,  $EC_{50}$  pasiklivimo intervalas būtų labai platus, ir gali būti neįmanoma tinkamai įvertinti parinkto modelio tinkamumo;
- iv) reikėtų vengti į bandomosios koncentracijos verčių intervalą įtraukti koncentracijos vertes, kurios būtų statistškai reikšmingos suaugusių gyvūnų išlikimui, nes taip pasikeistų bandymo principas, ir jis iš paprasto reprodukcijos bandymo taptų sudėtinio reprodukcijos ir gaištamumo bandymu, kuriam reikalinga daug sudėtingesnė statistinė analizė.

Tinkamas bandomąsias koncentracijas parinkti turėtų padėti anksčiau gautos žinios apie bandomąją medžiagą (pvz., trumpalaikio toksiškumo ir (ar) intervalo nustatymo tyrimų duomenys).

Jei bandomiesiems tirpalams ruošti naudojamas tirpiklis ar dispergatorius (žr. 1.6.4 skirsnį), jų galutinė koncentracija visuose bandymo induose turi būti vienoda ir ne didesnė kaip  $0,1 \text{ ml/l}$ .

## 1.8.3. Kontroliniai bandiniai

Be bandomosios medžiagos bandinių serijos, bandoma viena bandymo terpės kontrolinių bandinių serija ir, jei tinka, viena tirpiklio ar dispergatoriaus kontrolinių bandinių serija. Naudojamo tirpiklio ar dispergatoriaus koncentracija turi būti tokia, kokia yra induose su bandomąja medžiaga. Turi būti atliekamas atitinkamas skaičius lygiagrečiųjų bandymų (žr. 1.8.1.3 skirsnį).

Paprastai jei bandymas atliekamas tinkamai, kontrolinio (-ių) bandinio (-ių) variacijos apie vidutinę motininio gyvūno produkuotų palikuonių vertę koeficientas turi būti  $\leq 25 \%$ , ir jis turi būti nurodomas bandymo schemoms su atskirai laikomais gyvūnais.

#### 1.8.4. Bandomosios terpės atnaujinimas

Bandomosios terpės atnaujinimo dažnis priklauso nuo bandomosios medžiagos, tačiau ji turėtų būti atnaujinama tris kartus per savaitę. Jei pagal išankstinius stabilumo bandymus (žr. 1.4 skirsnį) bandomosios medžiagos koncentracija ilgiausiu (t. y. trijų parų) atnaujinimo laikotarpiu yra nestabili (t. y. yra už 80–120 % vardinės koncentracijos ribų ar yra mažesnė kaip 80 % išmatuotos pradinės koncentracijos), reikėtų numatyti dažnesnį terpės atnaujinimą arba taikyti dinaminį bandymą.

Kai atnaujinama pusiau statinių bandymų terpė, paruošiama antra bandymo indų serija, ir į juos pernešami motininiai gyvūnai naudojant, pvz., tinkamo skersmens stiklinę pipetę. Su *Daphnia* pernešamos terpės tūris turi būti kuo mažesnis.

#### 1.8.5. Matavimai

Stebėjimų rezultatai, gauti atliekant bandymą, registruojami specifikacijose (žr. 3 ir 4 priedėlių pavyzdžius). Jei reikia daryti kitus matavimus (žr. 1.3 ir 1.8.8), gali būti atliekami papildomi stebėjimai.

#### 1.8.6. Palikuonys

Kiekvieno motininio gyvūno atvestus palikuonis geriau atskirti ir skaičiuoti kasdien nuo pirmosios vados atsiradimo, kad jie nevirtotų suaugusiems gyvūnams skirtu maistu. Pagal šį metodą reikia skaičiuoti tik gyvus palikuonis, tačiau reikia registruoti neapvaisintų kiaušinių ar negyvų palikuonių skaičių.

#### 1.8.7. Gaištamumas

Motinių 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 subletalus rezultatus, kurie gali būti naudingesni nei vien tik reprodukcijos matavimas; baigiant bandymą rekomenduojama išmatuoti motininių gyvūnų ilgį (t. y. kūno ilgį, išskyrus analinį dyglį). Kiti parametrai, kuriuos galima išmatuoti ar apskaičiuoti, yra pirmosios vados (ir vėlesnių vadų) atsiradimo laikas, vieno gyvūno vadų skaičius ir dydis, neapvaisintų kiaušinių skaičius, vyriškos lyties atstovų ar *ephippia* buvimas ir populiacijos priaugio būdingasis greitis.

#### 1.8.9. Analizinių nustatymų ir matavimų dažnis

Degonies koncentracija, temperatūra, kietumas ir pH vertės turi būti matuojamos bent kartą per savaitę prieš ir po terpės atnaujinimo kontroliniame (-iuose) bandinyje (-iuose) ir induose su didžiausia bandomosios medžiagos koncentracija.

Atliekant bandymą bandomosios medžiagos koncentracijos vertės nustatomos reguliariais laiko tarpais.

Jei pusiau statiniuose bandymuose daroma prielaida, kad bandomosios medžiagos koncentracija lieka  $\pm 20\%$  vardinės koncentracijos vertės (t. y. 80–120 % intervalo, žr. 1.4 ir 1.8.4), rekomenduojama nustatyti bent didžiausią ir mažiausią bandomąją koncentraciją iš karto po tirpalo paruošimo ir prieš pat jo atnaujinimą pirmąją bandymo savaitę (t. y. turi būti atliekama to paties tirpalo mėginių analizė iš karto po tirpalo paruošimo ir jį atnaujinant). Vėliau šis nustatymas turi būti kartojamas bent kas savaitę.

Jei tai yra bandymai, kuriuos atliekant nesitikima, kad koncentracija liks  $\pm 20\%$  vardinės koncentracijos vertės, būtina analizuoti visų koncentracijos verčių bandomuosius tirpalus iš karto po jų paruošimo ir prieš pat atnaujinimą. Tačiau bandymuose, kur išmatuota pradinė bandomosios medžiagos koncentracija nesudaro  $\pm 20\%$  vardinės vertės, bet galima gauti pakankamai įrodymų, kad pradinės koncentracijos vertės yra pakartojamos ir stabilios (t. y. 80–120 % pradinės koncentracijos verčių intervalo), bandymo antrą ar trečią savaitę cheminių analizių skaičių galima sumažinti ir apsiriboti didžiausios ir mažiausios bandomosios koncentracijos nustatymu. Visais atvejais prieš atnaujinimą turi būti daromas tik vieno lygiagreto 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  $\pm 20\%$  vardinės koncentracijos ar išmatuotos pradinės koncentracijos vertės, rezultatai gali būti išreikšti vardinėmis ar išmatuotomis pradinėmis vertėmis. Jei vardinės ar išmatuotos pradinės koncentracijos nuokrypis yra didesnis kaip  $\pm 20\%$ , rezultatai turėtų būti išreikšiami kaip laiko svorinis vidurkis (žr. 5 priedėlį).

## 2. DUOMENYS IR ATASKAITA

### 2.1. REZULTATŲ APDOROJIMAS

Šio bandymo tikslas – nustatyti, kokį poveikį daro bandomoji medžiaga bendram kiekiui palikuonių, kuriuos atveda kiekvienas iki bandymo pabaigos gyvas išlikęs motininis gyvūnas. Bendras vieno motininio gyvūno palikuonių skaičius apskaičiuojamas kiekvienam bandymo indui (t. y. lygiagretusis bandinys). Jei kuriame nors inde motininis gyvūnas atliekant bandymą žūva arba pasirodo, kad yra vyriškos lyties, lygiagretusis bandinys iš analizės pašalinamas. Tuomet analizė bus pagrįsta mažesniu skaičiumi lygiagrečiųjų bandinių.

Norint įvertinti LOEC, taigi ir NOEC, susijusių su cheminės medžiagos poveikiu reprodukcijos našumui, būtina apskaičiuoti vidutinį reprodukcijos našumą visiems kiekvienos koncentracijos lygiagretiesiems bandiniams ir grupinį liekamąjį standartinį nuokrypį, o tai galima padaryti taikant dispersinę analizę (ANOVA). Toliau kiekvienos koncentracijos vidutinė vertė turi būti palyginta su kontrolinio bandinio vidutine verte taikant atitinkamą daugybinio lyginimo metodą. Gali būti naudingi Dunnetto ar Williamso bandymai (14) (15) (16) (17). Būtina patikrinti, ar taikant dispersinę analizę galioja sklaidos homogeniškumo prielaida. Rekomenduojama tai daryti grafiškai, o ne taikant formalų reikšmingumo kriterijų (18); tinkama alternatyva būtų Bartletto bandymas. Jei ši prielaida negalioja, reikėtų numatyti duomenų transformavimą sklaidoms homogenizuoti prieš atliekant dispersinę analizę ar atlikti svorinę dispersinę analizę. Taikant dispersinę analizę aptinkamo poveikio dydis (t. y. mažiausias reikšmingas skirtumas) turi būti apskaičiuotas ir pateiktas ataskaitoje.

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  $EC_{50}$  pasiklovimo ribų apskaičiavimą. Jei nėra svarbių priežasčių, kodėl turėtų būti naudojami kiti pasiklovimo lygiai, turi būti nurodyti dvipusės 95 % pasiklovimo ribos. Pritaikymo metodika geriau turėtų numatyti būdą atitikties nebuvimo reikšmingumui įvertinti. Tai galima padaryti grafiškai arba liekamąją kvadratų sumą padalijus į „atitikties nebuvimo“ dalį ir „grynos paklaidos komponentų“ dalį ir daryti atitikties nebuvimo reikšmingumo tikrinimą. Kadangi po apdorojimų, po kurių vaisingumas būna didelis, gali būti didesnė jauniklių skaičiaus sklaida negu po apdorojimų, po kurių vaisingumas būna mažas, reikėtų atsižvelgti į galimybę stebėtoms vertėms taikyti svorinius koeficientus, kad būtų galima atspindėti skirtingą sklaidą skirtingose apdorojimo grupėse (žr. (18) nuorodą, kurioje pateikiama pagrįdinė informacija).

Analizuojant galutinio tarplaboratorinio bandymo duomenis (2), logistinė kreivė buvo pritaikyta naudojant šį modelį, nors galima naudoti kitus tinkamus modelius:

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

Čia:

Y = bendras jauniklių skaičius, tenkantis vienam gyvam motininiam gyvūnui bandymo pabaigoje (apskaičiuotas kiekvienam indui),

x = medžiagos koncentracija,

c = laukiamas jauniklių skaičius, kai x = 0,

$x_0$  = populiacijos  $EC_{50}$ ,

b = krypties koeficiento parametras.



Šis modelis turėtų tikti daugeliui situacijų, tačiau pasitaikys bandymų, kuriems jis netinka. Reikėtų patikrinti modelio tinkamumą, kaip užsiminta pirmiau. Kai kuriais atvejais gali tikti *hormesis* modelis, kurį taikant būna didesnis mažų koncentracijų verčių poveikis (19).

Gali būti įvertintos kitos poveikio koncentracijos vertės, pvz.,  $EC_{10}$  ar  $EC_{20}$ , bet modelio parametrus 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 būseną ir atitinkamos fizikinės ir cheminės savybės,
- cheminio identifikavimo duomenys, įskaitant grynumą.

### 2.2.2. **Bandomieji gyvūnai:**

- klonas (jei nustatytas jo genotipas), tiekėjas ar šaltinis (jei žinomas) ir taikytos auginimo sąlygos. Jei naudojama ne *Daphnia magna* rūšis, tai turi būti nurodyta ataskaitoje ir pagrįsta.

### 2.2.3. **Bandymo sąlygos:**

- taikyta bandymo metodika (pvz., pusiau statinis ar dinaminis bandymas, tūris, įkrova ir *Daphnia* skaičius litrui),
- apšvietimo trukmė ir šviesos intensyvumas,
- bandymo schema (pvz., lygiagrečiųjų bandinių skaičius, vieno lygiagrečiojo bandinio motininių gyvūnų skaičius),
- naudotos auginimo terpės detalės,
- organinės medžiagos priedai, jei naudoti, įskaitant sudėtį, šaltinį, ruošimo metodą, pradinių tirpalų TOC/COD, gautų bandymo terpės TOC/COD verčių įvertinimas,
- išsami informacija apie maitinimą, įskaitant kiekį (mg C/*Daphnia*/parai) ir 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 bandymo induose nustatyti analizių rezultatai (žr. 4 priedėlio specifikacijų pavyzdžius); taip pat ataskaitoje pateikiamas metodo regeneravimo našumas ir nustatymo riba,
- vandens kokybė bandymo induose (t. y. pH, temperatūra, ištirpusio deguonies koncentracija, TOC ir (ar) COD bei kietumas, jei tinka) (žr. 3 priedėlio specifikacijos pavyzdį),
- išsamus kiekvieno motininio gyvūno gyvų palikuonių registravimas (žr. 3 priedėlio specifikacijos pavyzdį),
- nugaišusių motininių gyvūnų skaičius ir nugaišimo diena (žr. 3 priedėlio specifikacijos pavyzdį),



- kontrolinių bandinių vaisingumo variacijos koeficientas (pagrįstas bendru gyvų palikuonių skaičiumi, tenkančiu vienam iki bandymo pabaigos gyvam išlikusiam motininiam gyvūnui),
- vienam iki bandymo pabaigos gyvam išlikusiam motininiam gyvūnui tenkančio gyvų palikuonių bendro skaičiaus (kiekvienam lygiagrečiam bandiniui) ir bandomosios medžiagos koncentracijos grafikas,
- mažiausia pastebimą poveikį reprodukcijai sukelianti koncentracija (LOEC), įskaitant taikytų statistinių metodikų aprašymą ir nurodymą, kokio dydžio poveikis gali būti aptiktas, ir nepastebėto poveikio koncentracija (NOEC); jei tinka, taip pat turi būti pateikta motininių gyvūnų gaištamumo LOEC/NOEC,
- jei tinka, reprodukcijos  $EC_x$  ir pasiklovimo 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. Løkke, 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.

- 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 priedėlis

## VISIŠKAI APIBRĖŽTŲ ELENĐT M7 IR M4 TERPIŲ RUOŠIMAS

Aklimatizavimas *Elenđt* M7 ir M4 terpėse

Kai kurios laboratorijos turėjo sunkumų, norėdamos dafnijas pernešti tiesiai į M4 (1) ir M7 terpes. Tačiau šiek tiek pasisekė aklimatizuojant laipsniškai, t. y. perkeliant dafnijas iš jų terpės į 30 % *Elenđt*, paskui į 60 % *Elenđt* ir pagaliau į 100 % *Elenđt*. Gali reikėti aklimatizuoti visą mėnesį.

## RUOŠIMAS

## Mikroelementai

Atskirų mikroelementų pradiniai tirpalai (I) iš pradžių ruošiami naudojant tinkamo grynumo vandenį, pvz., dejonizuotą, distiliuotą arba atvirkštinio osmoso būdu gautą vandenį. Iš šių skirtingų tirpalų (I) ruošiamas antras pradinis tirpalas (II), kuriame yra visi mikroelementai (sudėtinis tirpalas), t. y.:

I pradinis tirpalas (atskira medžiaga)	Į vandenį įdėtas kiekis mg/l	Koncentracija (lyginant su M4 terpe) (kartų)	Ruošiant bendrą II pradinį tirpalą, į vandenį įpilto I pradinio tirpalo tūris ml/l	
			M4	M7
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	57 190	20 000	1,0	0,25
MnCl <sub>2</sub> * 4H <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> * 6H <sub>2</sub> O	3 040	20 000	1,0	0,25
NaBr	320	20 000	1,0	0,25
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> * 2H <sub>2</sub> O	1 260	20 000	1,0	0,25
CuCl <sub>2</sub> * 2H <sub>2</sub> O	335	20 000	1,0	0,25
ZnCl <sub>2</sub>	260	20 000	1,0	1,0
CuCl <sub>2</sub> * 6H <sub>2</sub> O	200	20 000	1,0	1,0
KI	65	20 000	1,0	1,0
Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	43,8	20 000	1,0	1,0
NH <sub>4</sub> VO <sub>3</sub>	11,5	20 000	1,0	1,0
Na <sub>2</sub> EDTA * 2H <sub>2</sub> O	5 000	2 000	—	—
FeSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O	1 991	2 000	—	—
Na <sub>2</sub> EDTA ir FeSO <sub>4</sub> tirpalai ruošiami atskirai, vėliau supilami kartu ir iškart apdorojami autoklave. Taip gaunamas:				
21 Fe-EDTA tirpalas		1 000	20,0	5,0

**M4 ir M7 terpės**

M4 ir M7 terpės naudojant II pradinį tirpalą, makroelementus ir vitaminus yra ruošiamos taip:

	Į vandenį įdėtas kiekis mg/l	Koncentracija (lyginant su M4 terpe) (kartų)	Terpei paruošti įpilto pradinio tirpalo tūris ml/l	
			M4	M7
II pradinis visų mikroelementų tirpalas		20	50	50

**Mitybinių makroelementų pradiniai tirpalai (atskira medžiaga)**

CaCl <sub>2</sub> * 2H <sub>2</sub> O	293 800	1 000	1,0	1,0
MgSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O	246 600	2 000	0,5	0,5
KCl	58 000	10 000	0,1	0,1
NaHCO <sub>3</sub>	64 800	1 000	1,0	1,0
Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> * 9H <sub>2</sub> O	50 000	5 000	0,2	0,2
NaNO <sub>3</sub>	2 740	10 000	0,1	0,1
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 430	10 000	0,1	0,1
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	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 kiekių:

Tiamino hidrochloridas	750	10 000	—	—
Ciankobalaminas (B <sub>12</sub> )	10	10 000	—	—
Biotinas	7,5	10 000	—	—

Vitaminų mišinio pradinis tirpalas laikomas užšaldytas mažomis alikvotinėmis dalimis. Į terpę vitaminai dedami prieš pat naudojimą.

*Pastaba* Jei ruošdami galutinę terpę norite išvengti druskų nuosėdų susidarymo, įpilkite alikvotines pradinio tirpalo dalis į maždaug 500–800 ml dejonizuoto vandens ir praskieskite iki 1 litro.

*Pastaba* Pirmąją publikaciją apie M4 terpę galima rasti Elendt, B. P. (1990). *Selenium deficiency in Crustacea; an ultrastructural approach to antennal damage in Daphnia magna* Straus. *Protoplasma*, 154, p. 25–33.

## 2 priedėlis

### BENDROSIOS ORGANINĖS ANGLIES (TOC) ANALIZĖ IR DUMBLIŲ MAISTO TOC KIEKIO NOMOGRAMŲ GAVIMAS

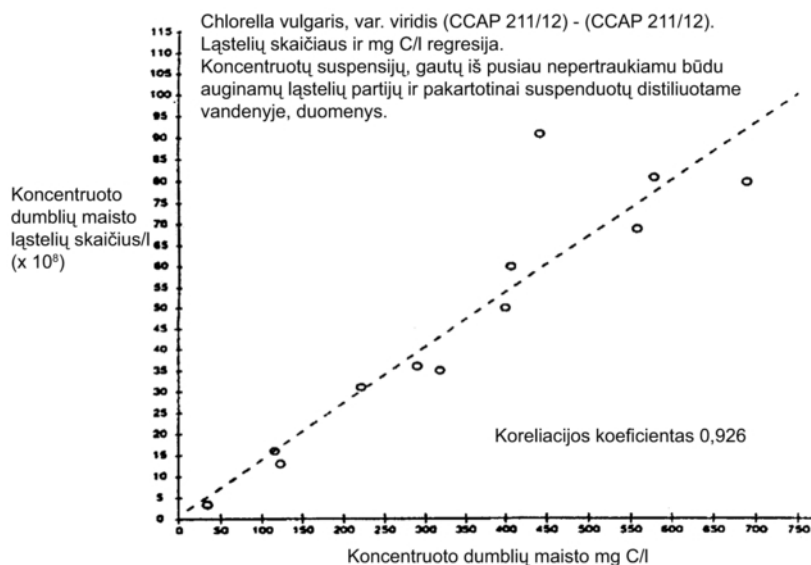
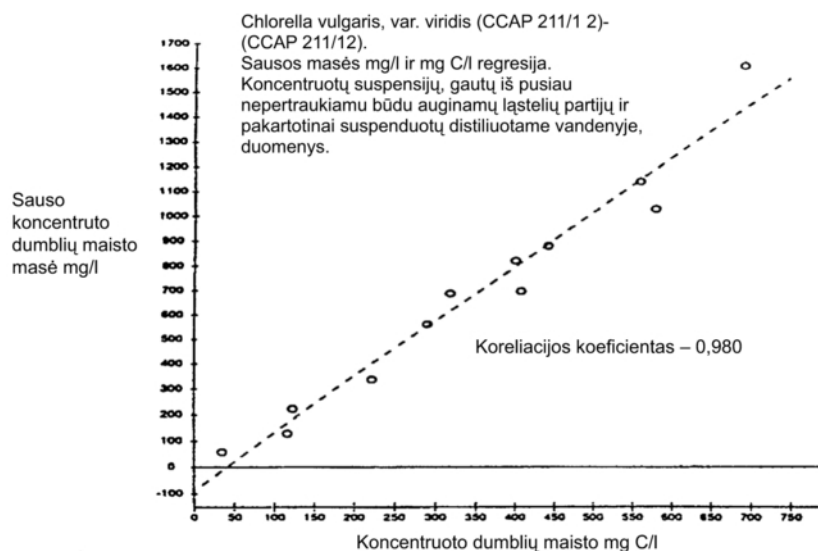
Pripažinta, kad dumblių maisto anglies kiekis tiesioginiu metodu paprastai nematuojamas, bet taikoma jo koreliacija (t. y. nomogramos) su pakeitimo parametrais, pvz., dumblių ląstelių skaičiumi ar šviesos absorbcija.

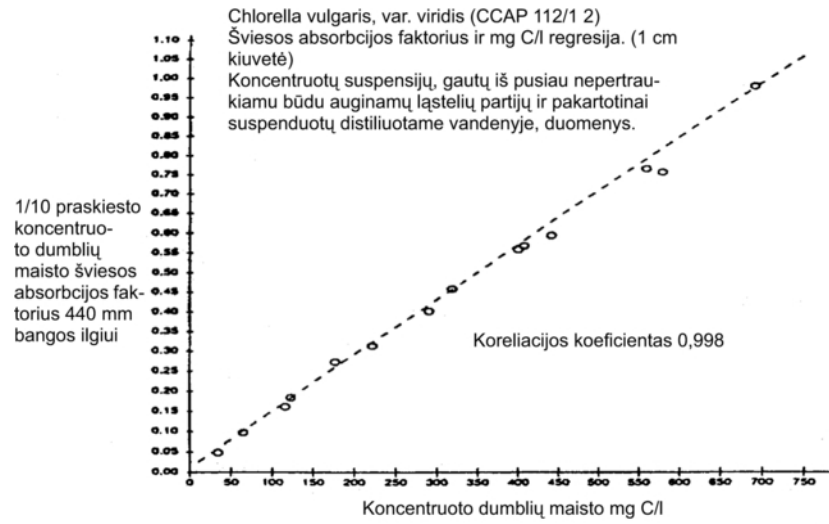
TOC reikėtų matuoti taikant oksidavimo aukštos temperatūros sąlygomis metodą, bet ne UV ar persulfatinį metodą (žr. *The Instrumental Determination of Total Organic Carbon, Total Oxygen Demand and Related Determinands* 1979, HMSO 1980; 49 High Holborn, London WC1V 6HB).

Nomogramai gauti dumbliai ir auginimo terpė atskiriami centrifuguojant, paskui dumbliai vėl suspenduojami distiliuotame vandenyje. Kiekvieno bandinio pakeitimo parametras ir TOC koncentracija matuojami tris kartus. Analizuojami distiliuoto vandens tuštieji bandiniai ir jų TOC koncentracija atimama iš dumblių bandinio TOC koncentracijos.

Nomograma nustatytam anglies koncentracijų diapazonui turėtų būti tiesinė. Pavyzdžiai pateikti toliau.

Pastaba. Jų negalima naudoti perskaičiavimams; svarbu, kad laboratorijos turėtų savo darytas nomogramas.





**TERPĖS ATNAUJINIMO, FIZIKOCHEMINIO MONITORINGO, MAITINIMO, DAFNIJŲ REPRODUKCIJOS IR SUAUGUSIŲ GYVŪNŲ GAIŠTAMUMO DUOMENŲ REGISTRAVIMO LENTELĖS  
PAVYZDYS**

Bandymo Nr.:	Pradžios data:				Klonas:		Terpė:				Maisto tipas:					Bandomoji medžiaga:				Vardinė konc.:					
	Para	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21		
Terpės atnaujinimas (dėti varnelę)																									
pH (1)																									naujos
																									senos
O <sub>2</sub> mg/l (1)																									naujos
																									senos
Temperatūra °C (1)																									naujos
																									senos
Duota maisto (dėti varnelę)																									
Nėra gyvų palikuonių (2)																									Bendras
1 indas																									
2																									
3																									
4																									
5																									
6																									
7																									
8																									





## 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

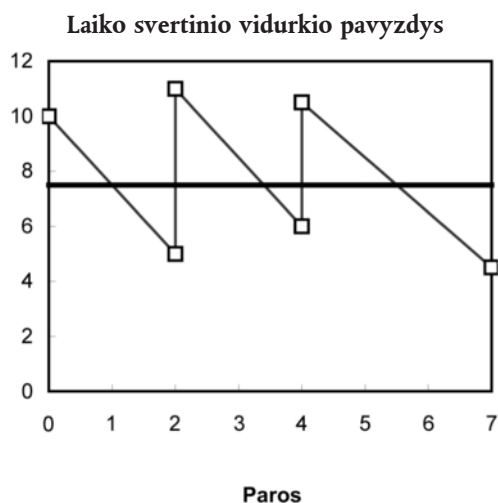
## 5 priedėlis

## LAIKO SVERTINIO VIDURKIO APSKAIČIAVIMAS

## Laiko svertinis vidurkis

Darant prielaidą, kad bandomosios medžiagos koncentracija laikotarpyje tarp terpės atnaujinimų gali mažėti, būtina nustatyti koncentracijos vertę, kuri atspindėtų motinines dafnijas veikiančios medžiagos koncentracijos verčių diapazoną. Pasirinkimas turi būti pagrįstas biologiniais ir statistiniais sumetimais. Pvz., jei manoma, kad reprodukciją labiausiai veikia didžiausia koncentracija, reikia naudoti didžiausios koncentracijos vertę. Tačiau jei svarbesniu laikomas kaupiamasis ar ilgalaikis toksiškos medžiagos poveikis, labiau tinka koncentracijos vidurkis. Šiuo atveju tinkamas naudoti vidurkis yra laiko svertinė vidutinė koncentracijos vertė, nes ją nustatant atsižvelgiama į momentinių koncentracijos kitimą laike.

## 1 paveikslas



1 paveiksle pateiktas septynių parų trukmės (supaprastinto) bandymo pavyzdys, terpę atnaujinant 0, 2 ir 4 parą.

Zigzagas rodo koncentracijos vertę bet kuriuo matavimo momentu. Daroma prielaida, kad koncentracijos mažėjimas atitinka irimo pagal eksponentę procesą.

Šeši pažymėti taškai rodo stebimas koncentracijų vertes, išmatuotas kiekvieno atnaujinimo laikotarpio pradžioje ir pabaigoje.

Stora linija rodo laiko svertinio vidurkio padėtį.

Laiko svertinis vidurkis apskaičiuojamas taip, kad plotas po laiko svertinio vidurkio tiese yra lygus plotui po koncentracijos kitimo kreivę. Pirmiau pateikto pavyzdžio apskaičiavimas parodytas 1 lentelėje.

## 1 lentelė

## Laiko svertinio vidurkio apskaičiavimas

Atnaujinimo Nr.	Paros	Konc. 0	Konc. 1	Ln(konc. 0)	Ln(konc. 1)	Plotas
1	2	10,000	4,493	2,303	1,503	13,767
2	2	11,000	6,037	2,398	1,798	16,544
3	3	10,000	4,066	2,303	1,403	19,781

Atnaujinimo Nr.	Paros	Konc. 0	Konc. 1	Ln(konc. 0)	Ln(konc. 1)	Plotas
Bendras parų skaičius: 7					Bendras plotas	50,091
					LS vidurkis	7,156

„Paros“ – atnaujinimo laikotarpio parų skaičius,

„Konc. 0“ – kiekvieno atnaujinimo laikotarpio pradžioje išmatuota koncentracija,

„Konc. 1“ – kiekvieno atnaujinimo laikotarpio pabaigoje išmatuota koncentracija,

„Ln(konc. 0)“ – konc. 0 natūralusis logaritmas,

„Ln(konc. 1)“ – konc. 1 natūralusis logaritmas,

„Plotas“ – plotas po eksponentės kreivę kiekvienam atnaujinimo laikotarpiui. Jis apskaičiuojamas:

$$\text{Plotas} = \left( \frac{\text{Conc0} - \text{Conc1}}{\text{Ln}(\text{Conc0}) - \text{Ln}(\text{Conc1})} \right) \times \text{Paros}$$

Laiko svertinis vidurkis („LS vidurkis“) yra „bendro ploto“ ir „bendro parų skaičiaus“ dalmuo.

Savaime aišku, kad darant dafnijų reprodukcijos bandymą lentelė turėtų būti išplėsta iki 21 paros.

Aišku, kad matuojant tik kiekvieno atnaujinimo laikotarpio pradžioje ir pabaigoje neįmanoma patvirtinti, kad irimo procesas iš tikrųjų vyksta eksponentiškai. Kitokiai kreivei būtų gautas kitas ploto apskaičiavimo rezultatas. Tačiau irimo pagal eksponentinę kreivę procesas nėra neįmanomas ir, kai nėra kitos informacijos, tai turbūt labiausiai naudoti tinkama kreivė.

Tačiau reikia būti atsargiems, jei, atnaujinimo laikotarpio pabaigoje atliekant cheminę analizę, nerandama jokios medžiagos. Jei negalima įvertinti, kaip greitai medžiaga išnyko iš tirpalo, neįmanoma gauti tikrojo ploto po kreivę, taigi neįmanoma gauti pagrįsto laiko svertinio vidurkio.

## C.21. DIRVOŽEMIO MIKROORGANIZMAI. AZOTO TRANSFORMAVIMO BANDYMAS

## 1. METODAS

Šis bandymo metodas atitinka OECD TG 216 (2000).

## 1.1. ĮVADAS

Šiame bandymo metode aprašytas laboratorinis metodas, skirtas ilgalaikiam poveikiui azoto virsme dalyvaujančių dirvožemio mikroorganizmų aktyvumui tirti, kai chemine medžiaga paveikiama vieną kartą. Bandymas iš esmės pagrįstas Europos ir Viduržemio jūros augalų apsaugos organizacijos (*European and Mediterranean Plant Protection Organization*) rekomendacijomis (1). Tačiau buvo atsižvelgta ir į kitus nurodymus, įskaitant Vokietijos *Biologische Bundesanstalt* (2), JAV aplinkos apsaugos agentūros (3) SETAC (4) ir Tarptautinės standartizacijos organizacijos (5) rekomendacijas. Belgirate, Italijoje, 1995 m. vykusiame OECD seminare dėl dirvožemių ir nuosėdinių uolienuų atrankos (6) buvo susitarta dėl šiame bandyme naudojamų dirvožemių skaičiaus ir tipo. Dirvožemio ėminių ėmimo, tvarkymo ir laikymo rekomendacijos pagrįstos ISO rekomendaciniu dokumentu (7) ir Belgirato seminaro rekomendacijomis. Įvertinant bandomųjų medžiagų toksiškumo charakteristikas, gali tekti nustatyti jų poveikį dirvožemio mikrobiniam aktyvumui, pvz., kai reikia turėti duomenų apie galimą šalutinį augalų apsaugos produktų poveikį dirvožemio mikroflorai arba kai tikimasi kitų nei augalų apsaugos produktai cheminių medžiagų poveikio dirvožemio mikroorganizmams. Azoto transformavimo bandymas atliekamas siekiant nustatyti tokių cheminių medžiagų poveikį dirvožemio mikroflorai. Jei bandomos agrocheminės medžiagos (pvz., augalų apsaugos produktai, trąšos, miškininkystėje naudojamos cheminės medžiagos), atliekami azoto transformavimo ir anglies transformavimo bandymai. Jei bandomos ne agrocheminės medžiagos, pakanka azoto transformavimo bandymo. Tačiau jei atliekant tokių cheminių medžiagų azoto transformavimo bandymą jų  $EC_{50}$  vertės patenka į intervalą, nustatytą prekyboje esantiems nitrifikacijos inhibitoriams (pvz., nitrapiriniui), papildomai informacijai gauti gali būti atliekamas anglies transformavimo bandymas.

Dirvožemį sudaro gyvieji ir negyvieji komponentai, esantys sudėtinuose ir heterogeniniuose mišiniuose. Mikroorganizmai vaidina svarbų vaidmenį vykstant derlingų dirvožemių organinių medžiagų skaidymui ir transformavimui, kai didelis rūšių skaičius prisideda prie įvairių dirvožemio derlingumo aspektų. Visi ilgalaikiai tokių biocheminių procesų trukdžiai gali pažeisti mitybinių elementų ciklą, o tai gali pakeisti dirvožemio derlingumą. Anglies ir azoto transformavimas vyksta visuose derlinguose dirvožemiuose. Nors už šiuos procesus atsakingos mikrobiologinės kolonijos įvairiuose dirvožemiuose yra skirtingos, transformavimo keliai iš esmės yra tokie patys.

Aprašytas bandymo metodas skirtas ilgalaikiam neigiamam medžiagos poveikiui azoto transformavimui aerobiniuose paviršiniuose dirvožemiuose nustatyti. Be to, taikant šį bandymo metodą galima įvertinti medžiagų poveikį dirvožemio mikroflora sukeliama anglies transformavimui. Nutrūkus anglies ir azoto jungtims, vyksta nitratų susidarymas. Taigi jei nustatoma, kad apdorotame ir kontroliniame dirvožemyje nitratų susidarymo greitis yra vienodas, yra didelė tikimybė, kad pagrindiniai anglies skaidymo keliai yra nepaliesti ir funkcionuoja. Bandymui pasirinktas substratas (liucernos milteliai) turi palankų anglies ir azoto santykį (paprastai nuo 12/1 iki 16/1). Dėl šios priežasties anglies trūkumas atliekant bandymą sumažėja ir jei cheminė medžiaga pažeistų mikrobiologines kolonijas, jos galėtų atsistatyti per 100 parų.

Bandymai, pagal kuriuos parengtas šis bandymo metodas, iš pradžių buvo skirti medžiagoms, kurių kiekį, pasiekiantį dirvožemį, buvo galima numatyti. Tai pasitaiko, pvz., naudojant augalų apsaugos produktus, kurių laukuose barstomos medžiagos norma yra žinoma. Bandant agrochemines medžiagas, pakanka dviejų dozių, atitinkančių numatomą arba prognozuojamą naudojimo normą. Agrochemines medžiagas galima bandyti kaip veikliuosius ingredientus (v. i.) arba kaip preparatus. Tačiau bandymas neapsiriboja agrocheminėmis medžiagomis. Keičiant į dirvožemį dedamos bandomosios medžiagos kiekį ir duomenų įvertinimo būdą, bandymą dar galima naudoti cheminėms medžiagoms, kurių kiekis, tikėtinai patenkantis į dirvožemį, yra nežinomas. Taigi, jei tai ne agrocheminės medžiagos, nustatomas medžiagos kelių koncentracijų verčių poveikis azoto transformavimui. Šių bandymų duomenys yra naudojami dozės ir reakcijos santykio kreivei gauti ir  $EC_x$  vertėms apskaičiuoti, kai  $x$  yra apibrėžiamas kaip poveikio %.

## 1.2. APIBRĖŽTYS

**Azoto transformavimas** – azoto turinčios organinės medžiagos skaidymas mikroorganizmais iki atitinkamo galutinio produkto, neorganinio nitrato, vykstant amonifikacijos ir nitrifikacijos procesams.

**$EC_x$  (efektyvioji koncentracija)** – bandomosios medžiagos koncentracija dirvožemyje, kai azoto transformavimas į nitratą inhibuojamas  $x$  procentų.

**EC<sub>50</sub> (vidutinė efektyvioji koncentracija)** – bandomosios medžiagos koncentracija dirvožemyje, kai azoto transformavimas į nitratą inhibuojamas 50 procentų (50 %).

### 1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Nėra.

### 1.4. BANDYMO METODO PRINCIPAS

Sijotas dirvožemis apdorojamas bandomąja medžiaga arba paliekamas neapdorotas (kontrolinis). Jei bandomos agrocheminės medžiagos, rekomenduojama naudoti mažiausiai dvi bandymo koncentracijas, kurios pasirenkamos pagal didžiausią lauke numatomą koncentraciją. Po 0, 7, 14 ir 28 inkubavimo parų apdoroti ir kontroliniai dirvožemio ėminiai ekstrahuojami atitinkamu tirpikliu ir ekstraktuose nustatomas nitrato kiekis. Lyginamas nitrato susidarymo greitis apdorotuose ir kontroliniuose ėminiuose ir apskaičiuojamas apdorotojo ėminio procentinis nuokrypis nuo kontrolinio ėminio. Visi bandymai atliekami mažiausiai 28 paras. Jei 28 parų 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 koncentracijų verčių bandymų rezultatai analizuojami taikant regresijos modelį ir apskaičiuojamos EC<sub>x</sub> vertės (t. y. EC<sub>50</sub>, EC<sub>25</sub> ir (arba) EC<sub>10</sub>). 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 %.

### 1.6. BANDYMO METODO APRAŠYMAS

#### 1.6.1. Aparatūra

Naudojami bandymo indai, pagaminti iš chemiškai inertiškos medžiagos. Jie turi būti reikiamos talpos atsižvelgiant į dirvožemio inkubavimui taikomą metodiką, t. y. viso vieno ėminio arba kelių atskirų dirvožemio dalinių ėminių inkubavimą (žr. 1.7.1.2 skirsnį). Reikia stengtis kiek įmanoma sumažinti vandens nuostolius, bet tuo pačiu užtikrinti dujų mainus atliekant bandymą (pvz., indai gali būti uždengiami polietileno plėvele su skylutėmis). Bandant lakiąsias medžiagas, reikia naudoti uždaromus ir sandarius dujoms indus. Jų dydis pasirenkamas taip, kad dirvožemio ėminys sudarytų maždaug vieną ketvirtąją indo tūrio.

Naudojama tipinė laboratorinė įranga, įskaitant šią:

- maišymo įtaisas: mechaninė purtyklė arba lygiavertė įranga,
- centrifuga (3 000 g) arba filtravimo įtaisas (filtravimo popierius be nitratų),
- atitinkamo jautrumo ir atkuriamumo nitratų analizės prietaisas.

#### 1.6.2. Dirvožemių pasirinkimas ir skaičius

Naudojamas vienos rūšies dirvožemis. Rekomenduojamas dirvožemis, kurio charakteristikos:

- smėlio kiekis: ne mažesnis kaip 50 % ir ne didesnis kaip 75 %;
- pH: 5,5–7,5;
- organinės anglies kiekis: 0,5–1,5 %;

- turėtų būti matuojama mikrobinė biomasė (8)(9), ir jos anglies kiekis turi sudaryti ne mažiau kaip 1 % bendrosios dirvožemio organinės anglies.

Dirvožemis, kurio tokios charakteristikos, dažniausiai atitinka blogiausią atvejį, kadangi cheminės medžiagos absorbcija yra mažiausia, o mikrofloros galimybė jos gauti yra didžiausia. Taigi bandymų su kitais dirvožemiais paprastai nereikia atlikti. Tačiau tam tikromis aplinkybėmis, pvz., jei medžiagą iš esmės numatoma naudoti konkrečiame dirvožemyje, pvz., rūgščiajame miško dirvožemyje, arba jei naudojamos 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 ėmimui pasirinkta vieta turėtų užtikrinti ilgalaikį naudojimą. Tinka nuolatinės ganyklos, laukai su kasmetiniais grūdininiais 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 pašėlims, o dirvožemio ėminiai imami ne anksčiau kaip trys mėnesiai po tręšimo. Reikia vengti naudoti dirvožemį, apdorotą trąšomis, turinčiomis žinomų biocidinių savybių (pvz., kalcio cianamidu).

Reikia vengti imti ėminius esant ilgalaikiam (ilgesniam kaip 30 parų) sausros arba potvynio laikotarpiui arba iš karto jam pasibaigus. Ariamų dirvožemių ėminiai imami iš 0–20 cm gylio. Pievose (ganyklose) arba kitame ilgą laiką (bent vieną auginimo sezoną) neariamuose dirvožemiuose didžiausias ėminio ėmimo gylis gali būti šiek tiek didesnis kaip 20 cm (pvz., iki 25 cm).

Dirvožemio ėminiai vežami tokiuose induose ir esant tokioms temperatūros sąlygoms, kurios 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  $4 \pm 2$  °C. Laikant 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).

#### 1.6.4.2. Fizinės ir cheminės savybės

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 pridendant organinio substrato

Dirvožemį reikėtų pagerinti atitinkamu organiniu substratu, pvz., žaliosios liucernos masės milteliais (pagrindinis komponentas: *Medicago sativa*), kurių C/N santykis yra nuo 12/1 iki 16/1. Rekomenduojamas liucernos ir dirvožemio santykis yra 5 g liucernos vienam kilogramui dirvožemio (sausos medžiagos masės).

#### 1.6.5. Bandomosios medžiagos ruošimas įterpti į dirvožemį

Bandomoji medžiaga paprastai įterpiama naudojant nešiklį. Nešikliu gali būti vanduo (vandenyje tirpių medžiagų) arba inertinė kietoji medžiaga, pvz., smulkus kvarcinis smėlis (dalelių dydis: 0,1–0,5 mm). Kitų nei vanduo skystųjų nešiklių (pvz., organinių tirpiklių, pvz., acetono, chloroformo) reikėtų vengti, kadangi jie gali pakenkti mikroflorai. Jei kaip nešiklis naudojamas smėlis, jo daleles galima padengti bandomąja medžiaga, ištirpinta arba suspenduota atitinkamame tirpiklyje. Tokiais atvejais prieš maišant su dirvožemiu tirpiklis išgarinamas. Siekiant optimaliai paskirstyti bandomąją medžiagą dirvožemyje, rekomenduojama naudoti 10 g smėlio vienam kilogramui dirvožemio (sausos medžiagos masės). Kontroliniai ėminiai apdorojami tik lygiaverčiu vandens ir (arba) kvarcinio smėlio kiekiu.

Jei bandomos lakiosios cheminės medžiagos, apdorojant reikia kiek įmanoma vengti nuostolių ir stengtis užtikrinti tolygų pasiskirstymą dirvožemyje (pvz., bandomąją medžiagą reikėtų išvirkšti keliuose dirvožemio vietose).

#### 1.6.6. Bandymo koncentracijos vertės

Jei bandomos agrocheminės medžiagos, naudojamos mažiausiai dvejopa koncentracija. Mažesnė koncentracija turėtų rodyti bent didžiausią kiekį, kuris tikėtinai pasiektų dirvožemį praktinėmis sąlygomis, tuo tarpu didesnė koncentracija turėtų būti mažesnės koncentracijos kartotinis dydis. Į dirvožemį įterpiamos bandomosios medžiagos koncentracijos vertės apskaičiuojamos darant prielaidą apie tolygų įterpimą į 5 cm gylį ir dirvožemio santykinį tankį 1,5. Agrocheminių medžiagų, tiesiogiai įterpiamų į dirvožemį, arba cheminių medžiagų, kurių dirvožemį pasiekiantis kiekis gali būti numatytas, rekomenduojamos bandymo koncentracijos vertės yra didžiausia numatoma aplinkos koncentracija (*Predicted Environmental Concentration* - PEC) ir penkis kartus didesnė koncentracija. Medžiagos, kurias numatoma įterpti į dirvožemį kelis kartus per vieną sezoną, bandomos esant koncentracijos vertėms, gautoms PEC vertę padauginus iš didžiausio numatomo įterpimų skaičiaus. Tačiau viršutinė bandymo koncentracijos vertė neturi būti daugiau kaip dešimt kartų didesnė už didžiausią vienkartinio įterpimo normą. Jei bandomos ne agrocheminės medžiagos, naudojama mažiausiai penkių koncentracijos verčių eilė pagal geometrinę progresiją. Bandymo koncentracijos vertės turi atitikti intervalą, reikalingą EC<sub>x</sub> vertėms nustatyti.

### 1.7. BANDYMO PROCEDŪRA

#### 1.7.1. Veikimo sąlygos

##### 1.7.1.1. Apdorojami ir kontroliniai ėminiai

Jei bandomos agrocheminės medžiagos, dirvožemis dalijamas į tris vienodos masės dalis. Dvi dalys maišomos su produkto turinčiu nešikliu, o trečioji maišoma su nešikliu be produkto (kontrolinis bandymas). Rekomenduojama paruošti mažiausiai tris kartotinius apdorotų dalių ir neapdorotos dalies dirvožemio ėminius. Jei bandomos ne agrocheminės medžiagos, dirvožemis dalijamas į šešias vienodos masės dalis. Penki ėminiai maišomi su bandomosios medžiagos turinčiu nešikliu, o šeštasis ėminys sumaišomas su nešikliu be cheminės medžiagos. Rekomenduojama paruošti bent tris apdorotų dirvožemio dalių ir neapdorotos dirvožemio dalies kartotinius ėminius. Reikia stengtis užtikrinti tolygų bandomosios medžiagos pasiskirstymą apdorotuose dirvožemio ėminiuose. Maišant reikėtų vengti dirvožemio sutankinimo ir grumstų susidarymo.

##### 1.7.1.2. Dirvožemio ėminių inkubavimas

Dirvožemio ėminius galima inkubuoti dviem būdais: kaip vientisus kiekvieno apdoroto ir neapdoroto dirvožemio ėminius arba kaip seriją atskirų ir vienodo dydžio kiekvieno apdoroto ir neapdoroto dirvožemio mėginių. Tačiau bandant lakiąsias medžiagas bandymas atliekamas tik vienu būdu, naudojant atskirų mėginių seriją. Kai dirvožemis inkubuojamas kaip vientisas ėminys, ruošiamas didelis kiekvieno apdoroto ir neapdoroto dirvožemio kiekis ir prireikus imami jo mėginiai analizei atliekant bandymą. Kiekvienam apdorotam ir kontroliniam ėminiui iš pradžių paruoštas kiekis priklauso nuo mėginių dydžio, analizei naudojamų kartotinių mėginių skaičiaus ir nuo numatomo didžiausio mėginių ėmimo kartų skaičiaus. Dirvožemiai, inkubuojami kaip vientisas ėminys, prieš imant mėginius turi būti gerai sumaišomi. Kai dirvožemiai inkubuojami kaip serija atskirų dirvožemio mėginių, kiekvienas apdorotas ir neapdorotas vientisas dirvožemio ėminys dalijamas į reikiamą mėginių skaičių, kurie prireikus yra naudojami. Atliekant bandymus, kuriuose gali būti numatyta mėginius imti daugiau kaip du kartus, reikia paruošti pakankamą skaičių mėginių, kad būtų galima atsižvelgti į visus kartotinius mėginius ir mėginių ėmimo kartų skaičių. Mažiausiai trys bandymo dirvožemio kartotiniai ėminiai inkubuojami aerobinėmis sąlygomis (žr. 1.7.1.1 skirsnį). Atliekant visus bandymus turi būti naudojami atitinkami indai su pakankamo tūrio laisvąja erdve, kad būtų išvengta anaerobinių sąlygų. Kai bandomos lakiosios medžiagos, bandymas turi būti atliekamas naudojant seriją atskirų mėginių.

##### 1.7.1.3. Bandymo sąlygos ir trukmė

Bandymas atliekamas tamsoje, esant  $20 \pm 2$  °C temperatūrai. Drėgmės kiekis dirvožemio ėminiuose visą bandymo laiką turi būti palaikomas  $\pm 5$  % tikslumu ir turi sudaryti nuo 40 % iki 60 % dirvožemio didžiausios vandens sulaiikymo gebos (žr. 1.6.4.2 skirsnį). Prireikus galima įpilti distiliuoto arba dejonizuoto vandens.

Mažiausia bandymų trukmė – 28 dienos. Jei bandomos agrocheminės medžiagos, lyginamas nitratų susidarymo greitis apdorotuose ir kontroliniuose ėminiuose. Jei 28 parą jis skiriasi daugiau kaip 25 %, bandymas tęsiamas tol, kol gaunamas 25 % arba mažesnis skirtumas, bet ne ilgiau kaip 100 parų. Jei bandomos ne agrocheminės medžiagos, bandymas baigiamas po 28 parų. 28 parą nustatomas nitratų kiekis apdorotuose ir kontroliniuose dirvožemio ėminiuose ir apskaičiuojamos  $EC_x$  vertės.

### 1.7.2. Dirvožemių ėminių ėmimas ir analizė

#### 1.7.2.1. Dirvožemio ėminių ėmimo grafikas

Jei bandomos agrocheminės medžiagos, dirvožemio ėminiai nitratui nustatyti analizuojami 0, 7, 14 ir 28 parą. Jei bandymą reikia tęsti, papildomi matavimai po 28 dienos daromi kas 14 parų.

Jei bandomos ne agrocheminės medžiagos, naudojamos mažiausiai penkios bandymo koncentracijos vertės ir dirvožemio ėminiai nitratui nustatyti analizuojami prieš bandymo pradžią (0 parų) ir veikimo laikotarpiui pasibaigus (28 parą). Jei manoma, kad būtinas tarpinis matavimas, jį galima daryti, pvz., 7 parą. Duomenys, gauti 28 parą, naudojami cheminės medžiagos  $EC_x$  vertei nustatyti. Jei pageidaujama, 0 dienos kontrolinių ėminių duomenys gali būti naudojami pradinei nitrato koncentracijai dirvožemyje pateikti.

#### 1.7.2.2. Dirvožemio ėminių analizė

Kiekvieną kartą paėmus ėminius, nustatomas nitrato kiekis, kuris susidaro kiekviename apdorotame ir kontroliniame kartotiniame ėminyje. Nitratas ekstrahuojamas iš dirvožemio ėminių purtant atitinkamame ekstrahavimo tirpiklyje, pvz., 0,1 mol/l kalio chlorido tirpale. Rekomenduojamas santykis 5 ml KC1 tirpalo vienam gramui dirvožemio, skaičiuojant sauso dirvožemio masei. Ekstrahavimui optimizuoti, dirvožemio ir ekstrahavimo tirpalo tūris neturi būti didesnis kaip pusė indo tūrio. Mišiniai purtomi 60 min. esant  $150 \text{ min}^{-1}$  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 transformavimo greitis įvertinamas taikant atitinkamus visuotinai priimtus statistinius metodus (pvz., F bandymą, 5 % reikšmingumo lygmuo). Susidariusio nitrato kiekis išreiškiamas mg nitrato/kg sauso dirvožemio/parai. Nitrato susidarymo kiekviename apdorotame ėminyje greitis lyginamas su greičiu, gautu kontroliniam ėminiai, ir apskaičiuojama procentais išreikšta nuokrypio nuo kontrolinio ėminio vertė.

Jei bandomos ne agrocheminės medžiagos, nustatomas kiekviename kartotiniame ėminyje susidariusio nitrato kiekis, ir  $EC_x$  vertėms įvertinti braižoma dozės ir reakcijos santykio kreivė. Nitrato kiekis (t. y. mg nitrato/kg sauso dirvožemio), nustatytas apdorotuose ėminiuose po 28 parų, lyginamas su kontroliniuose ėminiuose nustatytu kiekiu. Pagal šiuos duomenis kiekvienai bandymo koncentracijai apskaičiuojamos inhibavimo % vertės. Šios procentinės vertės pateikiamos grafike kaip koncentracijos funkcija, ir  $EC_x$  vertėms apskaičiuoti taikomos statistinės metodikos. Be to, taikant tipines metodikas (10) (11) (12), nustatomos apskaičiuotos  $EC_x$  vertės pasiklovimo ribos ( $p = 0,95$ ).

Didelį azoto kiekį turinčios bandomosios medžiagos gali prisidėti prie susidariusio nitrato kiekio padidėjimo atliekant bandymą. Jei šios medžiagos bandomos esant jų didelei koncentracijai (pvz., cheminės medžiagos, kurias numatoma naudoti dedant kelis kartus), į bandymo schemą turi būti įtraukti atitinkami kontroliniai ėminiai (t. y. dirvožemis su bandomąja medžiaga, bet be augalinių miltų). Į šių kontrolinių ėminių duomenis turi būti atsižvelgta apskaičiuojant  $EC_x$  vertes.

### 2.2. REZULTATŲ AIŠKINIMAS

Jei vertinant agrocheminių medžiagų bandymų rezultatus, ėminyje, turinčiame mažesnę koncentraciją (t. y. didžiausią numatomą koncentraciją), ir kontroliniame ėminyje nitrato susidarymo greičio skirtumas yra lygus 25 % arba mažesnis bet kuriuo mėginio ėmimo metu po 28 paros, produktą galima įvertinti kaip nedarantį ilgalaikio poveikio azoto transformavimui dirvožemiuose. Kai įvertinami kitų nei agrocheminės medžiagos cheminių medžiagų bandymo rezultatai, naudojamos  $EC_{50}$ ,  $EC_{25}$  ir (arba)  $EC_{10}$  vertės.



**3. ATASKAITA**

Bandymo ataskaitoje turi būti pateikta ši informacija:

Išsamus naudojamo dirvožemio identifikavimas, įskaitant:

- geografinę vietos nuorodą (platuma, ilguma),
- informacija apie vietos istoriją (t. y. augalinė danga, apdorojimas augalų apsaugos produktais, apdorojimas trąšomis, atsitiktiniai teršalai ir t. t.),
- naudojimo paskirtis (pvz., žemės ūkio paskirties žemė, miškas ir t. t.),
- ėminio ėmimo gylis (cm),
- smėlio/dumblo/molio kiekis (% sausos medžiagos masės),
- pH vertė (vandenyje),
- organinės anglies kiekis (% sausos medžiagos masės),
- azoto kiekis (% sausos medžiagos masės),
- pradinė nitrato koncentracija (mg nitrato/kg sausos medžiagos masės),
- jonų mainų geba (mmol/kg),
- mikrobine biomasė, išreikšta bendrosios organinės anglies procentine dalimi,
- metodų, taikytų kiekvienam parametru 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, fizikinės ir cheminės savybės,
- cheminio identifikavimo duomenys, jei tinka, įskaitant struktūrinę formulę, grynumą (t. y. augalų apsaugos produktų atveju veikliojo ingrediento procentinę dalį), azoto kiekį.

Substratas:

- substrato šaltinis,
- sudėtis (t. y. liucernos miltai, žaliosios liucernos masės miltai),
- anglies, azoto kiekis (% sausos medžiagos masės),
- sieto akučių dydis (mm).

Bandymo sąlygos:

- išsami informacija apie dirvožemio gerinimą organiniu substratu,
- naudotų bandomosios medžiagos koncentracijos verčių skaičius ir, jei tinka, pasirinktų koncentracijos verčių pagrindimas,
- išsami informacija apie bandomosios medžiagos įterpimą į dirvožemį,
- inkubavimo temperatūra,
- drėgmės kiekis dirvožemyje pradedant bandymą ir jį atliekant,
- taikytas dirvožemio inkubavimo metodas (t. y. kaip vientisas ėminys arba kaip keli mėginiai),
- kartotinių ėminių skaičius,
- ėminių ėmimo skaičius,
- metodas, taikomas nitratui iš dirvožemio ekstrahuoti.

Rezultatai:

- analizės metodika ir įranga, naudota nitratui analizuoti,
- lentelių duomenys, įskaitant atskiras ir vidutines nitrato analizės vertes,
- apdorotų ir kontrolinių kartotinių ėminių rezultatų nuokrypis,
- apskaičiavimams daromų pataisų aiškinimai, jei tinka,
- procentais išreikštas nitrato susidarymo greičio nuokrypis kiekvieną kartą imant mėginį, arba, jei tinka,  $EC_{50}$  vertė esant 95 procentų pasiklojimo ribai, kitos  $EC_x$  vertės (t. y.  $EC_{25}$  arba  $EC_{10}$ ) ir pasiklojimo ribos, dozės ir reakcijos santykio kreivės grafikas,
- statistinis rezultatų apdorojimas,
- visa informacija ir pastebėjimai, kurie padėtų aiškinti rezultatus.

#### 4. NUORODOS

- 1) EPPO (1994). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Chemicals. Chapter 7: Soil Microflora. EPPO Bulletin 24: 1–16, 1994.
- 2) BBA (1990). Effects on the Activity of the Soil Microflora. BBA Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, VI, 1–1 (2nd eds., 1990).
- 3) EPA (1987). Soil Microbial Community Toxicity Test. EPA 40 CFR Part 797.3700. Toxic Substances Control Act Test Guidelines; Proposed rule. September 28, 1987.
- 4) SET AC-Europe (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides, Ed. M.R. Lynch, Pub. SETAC-Europe, Brussels.

- 5) ISO/DIS 14238 (1995). Soil Quality – Determination of Nitrogen Mineralisation and Nitrification in Soils and the Influence of Chemicals on these Processes. Technical Committee ISO/TC 190/SC 4: *Soil Quality – Biological Methods*.
- 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.

## C.22. DIRVOŽEMIO MIKROORGANIZMAI. ANGLIES TRANSFORMAVIMO BANDYMAS

## 1. METODAS

Šis bandymo metodas atitinka OECD TG 217 (2000).

## 1.1. ĮVADAS

Šiame bandymo metode aprašytas laboratorinis metodas, skirtas ilgalaikiam poveikiui azoto transformavime dalyvaujančių dirvožemio mikroorganizmų aktyvumui tirti, kai chemine medžiaga paveikiama vieną kartą. Bandytas 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. vykusiame OECD seminare dėl dirvožemių ir nuosėdinių uolienų atrankos (5) buvo susitarta dėl šiame bandyme naudojamų dirvožemių skaičiaus ir tipo. Dirvožemio ėminių ėmimo, tvarkymo ir laikymo rekomendacijos pagrįstos ISO rekomendaciniu dokumentu (6) ir Belgirato seminaro rekomendacijomis.

Vertinant bandomųjų medžiagų toksiškumo charakteristikas, gali tekti nustatyti jų poveikį dirvožemio mikrobiam aktyvumui, pvz., kai reikia turėti duomenų apie galimą šalutinį augalų apsaugos produktų poveikį dirvožemio mikroflorai arba kai tikimasi kitų nei augalų apsaugos produktai cheminių medžiagų poveikio dirvožemio mikroorganizmams. Anglies transformavimo bandymas atliekamas siekiant nustatyti tokių cheminių medžiagų poveikį dirvožemio mikroflorai. Jei bandomos agrocheminės medžiagos (pvz., augalų apsaugos produktai, trąšos, miškininkystėje naudojamos cheminės medžiagos), atliekami anglies ir azoto transformavimo bandymai. Jei bandomos ne agrocheminės medžiagos, pakanka azoto transformavimo bandymo. Tačiau jei atliekant tokių cheminių medžiagų azoto transformavimo bandymą, jų  $EC_{50}$  vertės patenka į intervalą, nustatytą prekyboje esantiems nitrifikacijos inhibitoriams (pvz., nitrapirinu), papildomai informacijai gauti gali būti atliekamas anglies transformavimo bandymas.

Dirvožemį sudaro gyvieji ir negyvieji komponentai, esantys sudėtinuose ir heterogeniniuose mišiniuose. Mikroorganizmai vaidina svarbų vaidmenį vykstant derlingų dirvožemių organinių medžiagų skaidymui ir transformavimui, kai didelis rūšių skaičius prisideda prie įvairių dirvožemio derlingumo aspektų. Visi ilgalaikiai tokių biocheminių procesų trukdžiai gali pažeisti mitybinių elementų ciklą, o tai gali pakeisti dirvožemio derlingumą. Anglies ir azoto transformavimas vyksta visuose derlinguose dirvožemiuose. Nors už šiuos procesus atsakingos mikrobiologinės kolonijos įvairiuose dirvožemiuose yra skirtingos, transformavimo keliai iš esmės yra tokie patys.

Šis bandymo metodas skirtas nustatyti ilgalaikį neigiamą medžiagos poveikį anglies transformavimui aerobiniuose paviršiniuose dirvožemiuose. Šis bandymas yra jautrus už anglies transformavimą atsakingų mikrobinių kolonijų dydžio ir aktyvumo pokyčiams, kadangi atliekant šį bandymą, kolonijos patiria cheminio poveikio įtampą ir anglies badą. Naudojamas smėlėtas dirvožemis, turintis mažai organinių medžiagų. Šis dirvožemis apdorojamas bandomąja medžiaga ir inkubuojamas sąlygomis, kurios užtikrina greitą mikrobine medžiagų apykaitą. Šiomis sąlygomis greitai išsenka lengvai iš dirvožemio išsavinamos 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 veikiama dirvožemyje esančios cheminės medžiagos, biomasės kiekis gali neatsistatyti iki kontroliniame ėminyje esančio kiekio. Todėl bet kuriuo bandymo metu bandomosios medžiagos sukelti trukdžiai dažnai tęsiasi iki bandymo pabaigos.

Bandymai, naudoti šiam bandymo metodui parengti, iš pradžių buvo skirti medžiagoms, kurių kiekį, pasiekiantį dirvožemį, buvo galima numatyti. Taip pasitaiko, pvz., naudojant augalų apsaugos produktus, kurių laukuose barstomos medžiagos norma yra žinoma. Bandant agrochemines medžiagas, pakanka dviejų dozių, atitinkančių numatomą arba prognozuojamą naudojimo normą. Agrochemines medžiagas galima bandyti kaip veikliuosius ingredientus (v.i.) arba kaip preparatus. Tačiau bandymas neapsiriboja cheminėmis medžiagomis, turinčiomis prognozuojamas aplinkos koncentracijos vertes. Keičiant į dirvožemį dedamos bandomosios medžiagos kiekį ir duomenų įvertinimo būdą, bandymą dar galima naudoti cheminėms medžiagoms, kurių kiekis, tikėtinai patenkantis į dirvožemį, yra nežinomas. Taigi jei tai ne agrocheminės medžiagos, nustatomas medžiagos kelių koncentracijos verčių poveikis anglies transformavimui. Šių bandymų duomenys yra naudojami dozės ir reakcijos santykio kreivei gauti ir  $EC_x$  vertėms apskaičiuoti, kai  $x$  yra apibrėžiamas kaip poveikio %.

## 1.2. APIBRĖŽTYS

**Anglies transformavimas** – organinės medžiagos skaidymas mikroorganizmais iki atitinkamo neorganinio galutinio produkto – anglies dioksido.

**EC<sub>x</sub> (efektyvioji koncentracija)** – bandomosios medžiagos koncentracija dirvožemyje, kai anglies transformavimas į anglies dioksidą inhibuojamas x procentų.

**EC<sub>50</sub> (vidutinė efektyvioji koncentracija)** – bandomosios medžiagos koncentracija dirvožemyje, kai anglies transformavimas į anglies dioksidą inhibuojamas 50 procentų.

### 1.3 ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Nėra.

### 1.4. BANDYMO METODO PRINCIPAS

Sijotas dirvožemis apdorojamas bandomąja medžiaga arba paliekamas neapdorotas (kontrolinis). Jei bandomos agrocheminės medžiagos, rekomenduojama naudoti mažiausiai 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 atliekami mažiausiai 28 paras. Jei 28 parą apdoroto ir neapdoroto dirvožemio skirtumas yra lygus arba didesnis kaip 25 %, matavimai tęsiami kas 14 parų ne daugiau kaip iki 100 parų. Jei bandomos ne agrocheminės medžiagos, į dirvožemio ėminus dedama kelių koncentracijų verčių bandomoji medžiaga, ir po 28 parų matuojamas gliukozės sukeliama kvėpavimo greitis (t. y. susidariusio anglies dioksido arba suvartoto deguonies vidutinis kiekis). Koncentracijų verčių serijos bandymų rezultatai analizuojami taikant regresijos modelį ir apskaičiuojamos EC<sub>x</sub> vertės (t. y. EC<sub>50</sub>, EC<sub>25</sub> ir (arba) EC<sub>10</sub>). Žr. apibrėžtis.

### 1.5. BANDYMO TINKAMUMAS

Bandymų su agrocheminėmis medžiagomis rezultatai pagrįsti palyginti mažu (t. y. vidutinė vertė ± 25 %) išsiskyrusio anglies dioksido arba suvartoto deguonies kiekio kontroliniame ir apdorotame dirvožemio ėminyje skirtumu, taigi didelė kontrolinių ėminių duomenų sklaida gali būti klaidingų rezultatų priežastimi. Todėl kartotinių kontrolinių ėminių rezultatų skirtumas turi būti mažesnis kaip ± 15 %.

### 1.6. BANDYMO METODO APRAŠYMAS

#### 1.6.1. Aparatūra

Naudojami bandymo indai, pagaminti iš chemiškai inertiškos medžiagos. Jie turi būti reikiamos talpos atsižvelgiant į dirvožemių inkubavimui taikomą metodiką, t. y. viso vieno ėminio arba kelių atskirų dirvožemio dalinių ėminių inkubavimą (žr. 1.7.1.2 skirsnį). Reikia stengtis kiek įmanoma sumažinti vandens nuostolius, bet tuo pačiu užtikrinti dujų mainus atliekant bandymą (pvz., indai gali būti uždengiami polietileno plėvele su skylutėmis). Bandant lakiąsias medžiagas, reikia naudoti uždaromus ir sandarius dujoms indus. Jų dydis pasirenkamas taip, kad dirvožemio ėminys sudarytų maždaug vieną ketvirtąją indo tūrio.

Gliukozės 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 %,
- pH: 5,5– 7,5,
- organinės anglies kiekis: 0,5– 1,5 %,
- matuojama mikrobinė biomasė (12)(13) ir jos anglies kiekis turi sudaryti ne mažiau kaip 1 % bendrosios dirvožemio organinės anglies.

Dirvožemis, kurio tokios charakteristikos, dažniausiai atitinka blogiausią atvejį, kadangi cheminės medžiagos absorbcija yra mažiausia, o mikrofloros galimybė jos gauti yra didžiausia. Taigi bandymų su kitais dirvožemiais paprastai nereikia atlikti. Tačiau tam tikromis aplinkybėmis, pvz., jei medžiagą iš esmės numatoma naudoti konkrečiame dirvožemyje, pvz., rūgščiajame miško dirvožemyje, arba naudojamos elektrostatinių krūvi 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 ėminui pasirinkta vieta turėtų užtikrinti ilgalaikį naudojimą. Tinka nuolatinės ganyklos, laukai su kasmetiniais grūdininiais augalais (išskyrus kukurūzus) arba tankiai pasėtų žaliųjų trąšų laukai. Pasirinkta ėminio ėmimo vieta neturi būti apdorojama augalų apsaugos produktais mažiausiai vienerius metus iki ėminių ėmimo. Be to, mažiausiai šešis mėnesius neturėjo būti dedama organinių trąšų. Mineralines trąšas galima naudoti tik tuo atveju, jei to reikia pasėliams, o dirvožemio ėminiai imami ne anksčiau kaip trys mėnesiai po tręšimo. Reikia vengti naudoti dirvožemį, apdorotą trąšomis, turinčiomis žinomų biocidinių savybių (pvz., kalcio cianamidas).

Reikia vengti imti ėminius esant ilgalaikiam (ilgesniam kaip 30 parų) sausros arba potvynio laikotarpiui arba iš karto jam pasibaigus. Ariamų dirvožemių ėminiai imami iš 0–20 cm gylio. Pievose (ganyklose) arba kituose ilgą laiką (bent vieną auginimo sezoną) neariamuose dirvožemiuose didžiausias ėminio ėmimo gylis gali būti šiek tiek didesnis kaip 20 cm (pvz., iki 25 cm). Dirvožemio ėminiai vežami tokiuose induose ir esant tokioms temperatūros sąlygoms, kurios neleistų reikšmingai pakisti pradinėms dirvožemio savybėms.

#### 1.6.3.2. *Laikymas*

Pageidautina naudoti neseniai lauke paimtus dirvožemius. Jei laikymo laboratorijoje neįmanoma išvengti, dirvožemiai gali būti ne ilgiau kaip tris mėnesius laikomi tamsoje, esant  $4 \pm 2$  °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  $-18$  °C. Laikomo dirvožemio mikrobinė biomasė matuojama prieš kiekvieną bandymą ir biomasės anglis turi sudaryti mažiausiai 1 % viso dirvožemio organinės anglies kiekio (žr. 1.6.2 skirsnį).

### 1.6.4. **Dirvožemio tvarkymas ir ruošimas bandymui**

#### 1.6.4.1. *Pradinis inkubavimas*

Jei dirvožemis buvo laikomas saugykloje (žr. 1.6.4.2 ir 1.7.1.3 skirsnius), rekomenduojama daryti pradinį inkubavimą, kurio trukmė būtų nuo 2 iki 28 parų. Temperatūra ir dirvožemio drėgmės kiekis pradinio inkubavimo laikotarpiu turi atitikti bandymo sąlygas (žr. 1.6.4.2 ir 1.7.1.3 skirsnius).

#### 1.6.4.2. *Fizikinės ir cheminės savybės*

Iš dirvožemio rankiniu būdu pašalinami dideli daiktai (pvz., akmenys, augalų dalys ir t. t.), tuomet drėgnas dirvožemis sijojamas iki 2 mm arba mažesnių dalelių. Drėgmės kiekis dirvožemio ėminyje reguliuojamas distiliuotu arba dejonizuotu vandeniu iki vertės, sudarančios 40–60 % didžiausios vandens sulaikymo gebos.

### 1.6.5. **Bandomosios medžiagos ruošimas įterpti į dirvožemį**

Bandomoji medžiaga paprastai įterpiama naudojant nešiklį. Kaip nešiklis gali būti naudojamas vanduo (vandenyje tirpių medžiagų) arba inertinė kietoji medžiaga, pvz., smulkus kvarcinis smėlis (dalelių dydis: 0,1–0,5 mm). Kitų nei vanduo skystųjų nešiklių (pvz., organinių tirpiklių, pvz., acetono, chloroformo) reikėtų vengti, kadangi jie gali kenkti mikroflorai. Jei kaip nešiklis naudojamas smėlis, jo daleles galima padengti bandomąja medžiaga, ištirpinta arba suspenduota atitinkamame tirpiklyje. Tokiais atvejais prieš maišant su dirvožemiu tirpiklis išgarinamas. Siekiant optimaliai paskirstyti bandomąją medžiagą dirvožemyje, rekomenduojama naudoti 10 g smėlio vienam kilogramui dirvožemio (sausos medžiagos masės). Kontroliniai ėminiai apdorojami tik lygiaverčiu vandeniu 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 keliuose dirvožemio vietose).

#### 1.6.6. **Bandyto koncentracijos vertės**

Jei bandomi augalų apsaugos produktai arba kitos numatomos aplinkos koncentracijos medžiagos, turi būti bandoma mažiausiai dvejopa koncentracija. Mažesnė koncentracija turėtų rodyti bent didžiausią kiekį, kuris tikėtinai pasiektų dirvožemį praktinėmis sąlygomis, tuo tarpu didesnė koncentracija turėtų būti mažesnės koncentracijos kartotinis dydis. Į dirvožemį įterpiamos bandomosios medžiagos koncentracijos vertės apskaičiuojamos darant prielaidą apie tolygų įterpimą į 5 cm gylį ir dirvožemio santykinį tankį 1,5. Agrocheminių medžiagų, tiesiogiai įterpiamų į dirvožemį, arba cheminių medžiagų, kurių dirvožemį pasiekiantis kiekis gali būti numatytas, rekomenduojamos bandymo koncentracijos vertės yra didžiausia numatoma aplinkos koncentracija (*Predicted Environmental Concentration – PEC*) ir penkis kartus didesnė koncentracija. Medžiagos, kurias numatoma įterpti į dirvožemį kelis kartus per vieną sezoną, bandomos esant koncentracijos vertėms, gautoms *PEC* vertę padauginus iš didžiausio numatomo įterpimų skaičiaus. Tačiau viršutinė bandymo koncentracijos vertė neturi būti daugiau kaip dešimt kartų didesnė už didžiausią vienkartinio įterpimo normą.

Jei bandomos ne agrocheminės medžiagos, naudojama mažiausiai penkių koncentracijos verčių eilė pagal geometrinę progresiją. Bandyto koncentracijos vertės turi atitikti intervalą, reikalingą  $EC_x$  vertėms nustatyti.

#### 1.7. BANDYMO PROCEDŪRA

##### 1.7.1. **Veikimo sąlygos**

##### 1.7.1.1. *Apdorojami ir kontroliniai ėminiai*

Jei bandomos agrocheminės medžiagos, dirvožemis dalijamas į tris vienodos masės dalis. Dvi dalys maišomos su produkto turinčiu nešikliu, o trečioji maišoma su nešikliu be produkto (kontrolinis bandymas). Rekomenduojama paruošti mažiausiai tris kartotinius apdorotų dalių ir neapdorotos dalies dirvožemio ėminius. Jei bandomos ne agrocheminės medžiagos, dirvožemis dalijamas į šešias vienodos masės dalis. Penki ėminiai maišomi su bandomosios medžiagos turinčiu nešikliu, o šeštasis ėminys sumaišomas su nešikliu be cheminės medžiagos. Rekomenduojama paruošti mažiausiai tris apdorotų dirvožemio dalių ir neapdorotos dirvožemio dalies kartotinius ėminius. Reikia stengtis užtikrinti tolygų bandomosios medžiagos pasiskirstymą apdorotuose dirvožemio ėminiuose. Maišant reikėtų vengti dirvožemio sutankinimo ir grumstų susidarymo.

##### 1.7.1.2. *Dirvožemio ėminių inkubavimas*

Dirvožemio ėminius galima inkubuoti dviem būdais: kaip vientisus kiekvieno apdoroto ir neapdoroto dirvožemio ėminius arba kaip seriją atskirų ir vienodo dydžio kiekvieno apdoroto ir neapdoroto dirvožemio mėginių. Tačiau bandant lakiąsias medžiagas, bandymas atliekamas tik vienu būdu, naudojant atskirų mėginių seriją. Kai dirvožemis inkubuojamas kaip vientisas ėminys, ruošiamas didelis kiekvieno apdoroto ir neapdoroto dirvožemio ėminio kiekis ir prireikus imami jo mėginiai analizei atliekant bandymą. Kiekvienam apdorojimui ir kontroliniams ėminiams iš pradžių paruoštas kiekis priklauso nuo mėginių dydžio, analizei naudojamų kartotinių mėginių skaičiaus ir nuo numatomo didžiausio mėginių ėmimo kartų skaičiaus. Dirvožemis, inkubuojamas kaip vientisas ėminys, prieš imant mėginius turi būti gerai sumaišomas. Kai dirvožemis inkubuojamas kaip serija atskirų dirvožemio mėginių, kiekvienas apdorotas ir neapdorotas vientisas dirvožemio ėminys dalijamas į reikiamą mėginių skaičių, kurie prireikus yra naudojami. Atliekant bandymus, kuriuose gali būti numatyta mėginius imti daugiau kaip du kartus, reikia paruošti pakankamą skaičių mėginių, kad būtų galima atsizvelgti į visus kartotinius mėginius ir mėginių ėmimo kartų skaičių. Mažiausiai trys bandymo dirvožemio kartotiniai ėminiai inkubuojami aerobinėmis sąlygomis (žr. 1.7.1.1 skirsnį). Atliekant visus bandymus turi būti naudojami atitinkami indai su pakankamo tūrio laisvąja erdve, kad būtų išvengta anaerobinių sąlygų. Kai bandomos lakiosios medžiagos, bandymas turi būti atliekamas naudojant seriją atskirų mėginių.

##### 1.7.1.3. *Bandyto sąlygos ir trukmė*

Bandymas atliekamas tamsoje, esant  $20 \pm 2$  °C temperatūrai. Drėgmės kiekis dirvožemio ėminiuose visą bandymo laiką turi būti palaikomas  $\pm 5$  % tikslumu ir turi sudaryti nuo 40 % iki 60 % dirvožemio didžiausios vandens sulaikymo gebos (žr. 1.6.4.2 skirsnį). Prireikus galima įpilti distiliuoto arba dejonizuoto vandens.

Mažiausia bandymų trukmė – 28 dienos. Jei bandomos agrocheminės medžiagos, lyginami išsiskyrusio anglies dioksido arba suvartoto deguonies kiekiai apdorotuose ir kontroliniuose ėminiuose. Jei 28 parą jie skiriasi daugiau kaip 25 %, bandymas tęsiamas tol, kol gaunamas 25 % arba mažesnis skirtumas, bet ne ilgiau kaip 100 parų. Jei bandomos ne agrocheminės medžiagos, bandymas baigiamas po 28 parų. 28 parą nustatomas išsiskyrusio anglies dioksido arba suvartoto deguonies kiekis apdorotuose ir kontroliniuose dirvožemio ėminiuose ir apskaičiuojamos  $EC_x$  vertės.

## 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  $EC_x$  vertei nustatyti. Jei pageidaujama, 0 dienos kontrolinių ėminių duomenys gali būti naudojami pradiniam veikliosios mikrobinės biomasės, dalyvaujančios medžiagų apykaitoje, kiekiui dirvožemyje įvertinti (12).

### 1.7.2.2. Gliukozės 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, atliekant pradinį bandymą su keliomis gliukozės koncentracijos vertėmis (14). Tačiau smėlio dirvožemiui, turinčiam 0,5–1,5 % organinės anglies, paprastai pakanka 2 000–4 000 mg gliukozės vienam kg sauso dirvožemio. Gliukozę galima sumalti į miltelius su švariu kvarciniu smėliu (10 g smėlio/kg sauso dirvožemio) ir paruošti vienalytį mišinį su dirvožemiu.

Gliukoze pagerinto dirvožemio ėminiai inkubuojami tinkamame aparate kvėpavimo greičiui matuoti nepertraukiamai, kas valandą arba kas dvi valandas (žr. 1.6.1 skirsnį), esant  $20 \pm 2$  °C. Išsiskyrusio anglies dioksido arba suvartoto deguonies kiekis matuojamas 12 h iš eilės, matavimus pradedant kiek įmanoma anksčiau, t. y. 1–2 h po gliukozės pridėjimo. Išmatuojamas bendras per 12 h išsiskyrusio anglies dioksido arba suvartoto deguonies kiekis ir nustatomas vidutinis kvėpavimo greitis.

## 2. DUOMENYS

### 2.1. REZULTATŲ APDOROJIMAS

Jei bandomos agrocheminės medžiagos, užrašomas kiekviename kartotiniame dirvožemio ėminyje susidariusio anglies dioksido arba suvartoto deguonies kiekis ir visų kartotinių ėminių vidutinės vertės pateikiamos lentelėse. Rezultatai įvertinami taikant atitinkamus visuotinai priimtus statistinius metodus (pvz., F bandymą, 5 % reikšmingumo lygmuo). Gliukozės 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.

Jei bandomos ne agrocheminės medžiagos, nustatomas kiekviename kartotiniame ėminyje išsiskyrusio anglies dioksido arba suvartoto deguonies kiekis, ir  $EC_x$  vertėms įvertinti braižoma dozės ir reakcijos santykio kreivė. Gliukozės sukeliama kvėpavimo greitis (t. y. mg anglies dioksido arba mg deguonies/kg sauso dirvožemio/h), nustatytas apdorotuose ėminiuose po 28 parų, lyginamas su kontroliniams ėminiams nustatytu greičiu. Pagal šiuos duomenis kiekvienai bandymo koncentracijai apskaičiuojamos inhibavimo % vertės. Šios procentinės vertės pateikiamos grafike kaip koncentracijos funkcija, o  $EC_x$  vertėms apskaičiuoti taikomos statistinės metodikos. Be to, taikant tipines metodikas (15) (16) (17), nustatomos apskaičiuotos  $EC_x$  vertės pasiklovimo ribos ( $p = 0,95$ ).

### 2.2. REZULTATŲ AIŠKINIMAS

Jei vertinant agrocheminių medžiagų bandymų rezultatus, ėminyje, turinčiame mažesnę koncentraciją (t. y. didžiausią numatomą koncentraciją), bei kontroliniame ėminyje kvėpavimo greičio skirtumas bet kuriuo mėginio ėmimo metu po 28 paros yra lygus 25 % arba mažesnis, produktą galima įvertinti kaip nedarantį ilgalaikio poveikio anglies transformavimui dirvožemiuose. Kai įvertinami kitų nei agrocheminės medžiagos cheminių medžiagų bandymo rezultatai, naudojamos  $EC_{50}$ ,  $EC_{25}$  ir (arba)  $EC_{10}$  vertės.



3. **ATASKAITA**

## BANDYMO ATASKAITA

Bandyto ataskaitoje turi būti pateikta ši informacija:

Išsamus naudojamo dirvožemio identifikavimas, įskaitant:

- geografinę vietos nuorodą (platuma, ilguma),
- informaciją apie vietos istoriją (t. y. augalinė danga, apdorojimas augalų apsaugos produktais, apdorojimas trąšomis, atsitiktiniai teršalai ir t. t.),
- naudojimo tipą (pvz., žemės ūkio paskirties žemė, miškas ir t. t.),
- ėminio ėmimo gylį (cm),
- smėlio/dumblo/molio kiekį (% sausos medžiagos masės),
- pH vertę (vandenyje),
- organinės anglies kiekį (% sausos medžiagos masės),
- azoto kiekį (% sausos medžiagos masės),
- jonų mainų gebą (mmol/kg),
- pradinę mikrobinę biomasę, išreikštą bendrosios organinės anglies procentine dalimi,
- metodų, taikytų kiekvienam parametruui nustatyti, nuorodas,
- visą informaciją apie dirvožemio ėminių ėmimą ir laikymą,
- visą informaciją apie pradinio dirvožemio inkubavimą, jei daromas.

Bandomoji medžiaga:

- fizikinė būseną ir, jei tinka, fizikinės ir cheminės savybės,
- cheminio identifikavimo duomenys, jei tinka, įskaitant struktūrinę formulę, grynumą (t. y. augalų apsaugos produktų atveju veikliojo ingrediento procentinę dalį), azoto kiekį.

Bandyto sąlygos:

- išsami informacija apie dirvožemio gerinimą organiniu substratu,
- naudotų bandomosios medžiagos koncentracijos verčių skaičius ir, jei tinka, pasirinktų koncentracijos verčių pagrindimas,
- išsami informacija apie bandomosios medžiagos įterpimą į dirvožemį,
- inkubavimo temperatūra,
- drėgmės kiekis dirvožemyje pradedant bandymą ir jį atliekant,

- taikytas dirvožemio inkubavimo metodas (t. y. kaip vientisas ėminys arba kaip eilė atskirų mėginių),
- kartotinių ėminių skaičius,
- ėmimo skaičius.

#### Rezultatai:

- metodas ir įranga kvėpavimo greičiui matuoti,
- lentelių duomenys, įskaitant atskiras ir vidutines anglies dioksido arba deguonies vertes,
- apdorotų ir kontrolinių kartotinių ėminių rezultatų nuokrypis,
- apskaičiavimams daromų pataisų aiškinimai, jei tinka,
- procentais išreikštas gliukozės sukeliama kvėpavimo greičio nuokrypis kiekvieną kartą imant mėginį, arba, jei tinka,  $EC_{50}$  vertė esant 95 procentų pasiklovimo ribai, kitos  $EC_x$  vertės (t. y.  $EC_{25}$  arba  $EC_{10}$ ) ir pasiklovimo ribos, dozės ir reakcijos santykio kreivės grafikas,
- statistinis rezultatų apdorojimas, jei tinka,
- visa informacija ir pastebėjimai, kurie padėtų aiškinti rezultatus.

#### 4. NUORODOS

- 1) EPPO (1994). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Chemicals. Chapter 7: Soil Microflora. EPPO Bulletin 24: 1–16, 1994.
- 2) BBA (1990). Effects on the Activity of the Soil Microflora. BBA Guidelines for the Official Testing of 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) 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.

## C.23. AEROBINIS IR ANAEROBINIS TRANSFORMAVIMAS DIRVOŽEMYJE

## 1. METODAS

Šis bandymo metodas atitinka OECD TG 307 (2002)

## 1.1. ĮVADAS

Šis bandymo metodas pagrįstas esamomis rekomendacijomis (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9). Šiame bandymo metode aprašytas metodas skirtas cheminių medžiagų aerobiniam ir anaerobiniam transformavimui dirvožemyje įvertinti. Bandymai yra atliekami siekiant nustatyti: i) bandomosios medžiagos virsmo greitį ir ii) transformavimo produktų, kurie gali veikti augalus bei dirvožemio organizmus, tipą ir susidarymo bei išnykimo greitį. Taip turi būti tiriama cheminės medžiagos, kurios tiesiogiai įterpiamos į dirvožemį arba kurios gali pasiekti dirvožemio aplinką. Be to, tokių laboratorinių tyrimų rezultatai gali būti naudojami atitinkamų lauko tyrimų ėminių ėmimo ir analizės protokolams kurti.

Aerobinių ir anaerobinių tyrimų vieno tipo dirvožemiui paprastai pakanka virsmo keliams vertinti (8) (10) (11). Transformavimo greitis turėtų būti įvertinamas bent trims papildomiems dirvožemio tipams (8) (10).

Belgijoje, Italijoje, 1995 m. vykusiame OECD seminare dėl dirvožemių ir nuosėdinių uolienų atrankos (10) buvo konkrečiai sutarta dėl šiame bandyme naudojamų dirvožemių skaičiaus ir tipo. Bandomų dirvožemių tipas turėtų atitikti aplinkos sąlygas, kuriose medžiaga bus naudojama arba išmetama. Pvz., cheminės medžiagos, kurios gali būti išmetamos subtropinio arba tropinio klimato sąlygomis, turėtų būti bandomos *Ferralsol* arba *Nitosol* tipo dirvožemiuose (Maisto ir žemės ūkio organizacijos (FAO) sistema). Be to, seminare buvo pateiktos dirvožemio ėminių ėmimo, tvarkymo ir laikymo rekomendacijos, pagrįstos ISO rekomendaciniu dokumentu (15). Be to, šiame metode nagrinėjami ryžių laukų dirvožemiai.

## 1.2. APIBRĖŽTYS

**Bandomoji medžiaga** – bet kuri medžiaga (tai gali būti pradinis junginys arba medžiagos virsmo produktai).

**Transformavimo produktai** – visos medžiagos, susidarancios vykstant bandomosios medžiagos biotinio arba abiotinio virsmo reakcijoms, įskaitant CO<sub>2</sub> ir surištuosius likučius.

**Surištieji likučiai** – dirvožemyje, augale arba gyvūne esantys junginiai, kurie po ekstrahavimo lieka matricoje pradinės medžiagos arba jos metabolito (-ų) ar transformavimo produktų pavidalu. Ekstrahavimo metodas iš esmės turi nekeisti pačių junginių arba matricos struktūros. Ryšio prigimtį galima iš dalies išaiškinti, taikant matricą keičiančius ekstrahavimo metodus ir sudėtingus analizės metodus. Pvz., tokiu būdu iki šiol yra identifikuotos kovalentinės, joninės ir sorbcinio tipo jungtys, be to, pagautieji junginiai. Apskritai, surištųjų likučių susidarymas labai mažina biologinį įsisavinamumą ir biologinį kaupimąsi (12) (modifikuota IUPAC 1984 (13) apibrėžtis).

**Aerobinis transformavimas** – reakcijos, vykstančios esant molekuliniam deguoniui (14).

**Anaerobinis transformavimas** – reakcijos, vykstančios nesant molekulinio deguonies (14).

**Dirvožemis** – mineralinių ir organinių cheminių sudedamųjų dalių mišinys, kuriame organinius komponentus sudaro didelį anglies ir azoto kiekį turintys ir didelės molekulinės masės junginiai ir kurio gyvieji organizmai yra maži (daugiausia mikro-) organizmai. Galima apdoroti dviejų būsenų dirvožemį:

- nepaliestą, koks susidaro per laiką, esantį tipiškuose įvairių dirvožemio tipų sluoksniuose;
- palietą, koks jis paprastai yra ariamuose laukuose arba koks jis imamas kasant ir panaudojamas šiame bandymo metode (14).

**Mineralizacija** – yra visiškas organinio junginio skilimas į CO<sub>2</sub> ir H<sub>2</sub>O aerobinėmis sąlygomis, ir į CH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub> bei H<sub>2</sub>O anaerobinėmis sąlygomis. Šiame bandymo metode, kai naudojamas <sup>14</sup>C žymėtasis junginys, mineralizacija yra didelio laipsnio skilimas, kai žymėtasis anglies atomas oksiduojamas, susidarant atitinkamam <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> kiekiui (14).

**Pusėjimo trukmė** –  $t_{0,5}$ , laikas, per kurį bandomosios medžiagos koncentracija sumažėja 50 %, kai transformavimui aprašyti tinka pirmojo laipsnio kinetika; ji nepriklauso nuo koncentracijos.

**DT<sub>50</sub> (išnykimo trukmė 50)** – laikas, per kurį bandomosios medžiagos koncentracija sumažėja 50 %; ši trukmė ir pusėjimo trukmė  $t_{0,5}$  skiriasi, kai transformavimas neatitinka pirmojo laipsnio kinetikos.

**DT<sub>75</sub> (išnykimo trukmė 75)** – laikas, per kurį bandomosios medžiagos koncentracija sumažėja 75 %.

**DT<sub>90</sub> (išnykimo trukmė 90)** – laikas, per kurį bandomosios medžiagos koncentracija sumažėja 90 %.

### 1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Etaloninės medžiagos naudojamos, jei transformavimo produktams apibūdinti ir (arba) identifikuoti taikomi spektroskopiniai ir chromatografijos metodai.

### 1.4. BANDYMO TINKAMUMAS

Metodas tinka visoms cheminėms medžiagoms (nežymėtoms arba žymėtoms), kurioms nustatyti yra sukurtas pakankamo tikslumo ir jautrio analizės metodas. Jis tinka mažai lakiems, nelakiems, vandenyje tirpiems arba netirpiems junginiams. Bandytas neturi būti taikomas cheminėms medžiagoms, kurios labai greit išgaruoja iš dirvožemio (pvz., fumigantai, organiniai tirpikliai), todėl negali būti laikomos dirvožemyje šio bandymo sąlygomis.

### 1.5. INFORMACIJA APIE BANDOMĄJĄ MEDŽIAGĄ

Transformavimo greičiui matuoti gali būti naudojama pažymėtoji arba žymėtoji bandomoji medžiaga. Žymėtoji medžiaga reikalinga transformavimo keliui tirti ir masių balansui nustatyti. Rekomenduojama žymėti <sup>14</sup>C, bet gali būti naudingi kiti izotopai, pvz., <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N, <sup>3</sup>H, <sup>32</sup>P. Kiek tai įmanoma, žymėtasis atomas turi būti patvariausioje (-iose) molekulės dalyje (-yse) <sup>(1)</sup>. Bandomosios medžiagos grynumas turi būti mažiausiai 95 %.

Prieš pradėdant atlikti aerobinio ir anaerobinio transformavimo dirvožemyje bandymą, turi būti gauta ši informacija apie bandomąją medžiagą:

- a) tirpumas vandenyje (A.6 metodas);
- b) tirpumas organiniuose tirpikliuose;
- c) garų slėgis (A.4 metodas) ir Henrio dėsnio konstanta;
- d) pasiskirstymo koeficientas (n-oktanolis/vanduo) (A.8 metodas);
- e) cheminis patvarumas tamsoje (hidrolizė) (C.7 metodas);
- f) pK<sub>a</sub> jei molekulė gali atiduoti arba prisijungti protonus (OECD TG 112) (16).

Kitą naudingą informaciją gali sudaryti duomenys apie bandomosios medžiagos toksišką poveikį dirvožemio mikroorganizmams [bandymo metodai C.21 ir C.22] (16).

Reikia turėti analizės metodus (įskaitant ekstrahavimo ir gryninimo metodus) bandomajai medžiagai ir jos transformavimo produktams identifikuoti ir kiekybiškai nustatyti.

<sup>(1)</sup> 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.

## 1.6. BANDYMO METODO PRINCIPAS

Dirvožemio ėminiai apdorojami bandomąja medžiaga ir inkubuojami tamsoje, naudojant biometrines kolbas arba pratekėjimo sistemas kontroliuojamomis laboratorinėmis sąlygomis (esant pastoviai temperatūrai ir dirvožemio drėgmei). Po tam tikro intervalo dirvožemio ėminiai ekstrahuojami ir analizuojami pradinei medžiagai ir jos transformavimo produktams nustatyti. Be to, naudojant atitinkamus absorbcijos įtaisus, renkami ir analizuojami lakieji produktai. Naudojant  $^{14}\text{C}$  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).

### 1.7.2. Analizės metodo pakartojamumas ir jautrumas

Bandomosios medžiagos ir transformavimo produktų kiekybinės analizės metodo pakartojamumas (išskyrus pradinį ekstrahavimo efektyvumą) gali būti patikrintas atliekant kartotinę to paties dirvožemio, inkubuoto pakankamai ilgai, kad galėtų susidaryti transformavimo produktai, ekstrakto analizę.

Bandomosios medžiagos ir transformavimo produktų analizės metodo aptikimo riba (LOD) turi būti mažiausiai  $0,01 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$  dirvožemio (kaip bandomosios medžiagos) arba 1 % įterpiamos dozės, imant mažesniąją vertę. Turi būti apibrėžta kiekybinio nustatymo riba (LOQ).

### 1.7.3. Transformavimo duomenų tikslumas

Atliekant bandomosios medžiagos koncentracijos verčių kaip laiko funkcijos regresinę analizę gaunama atitinkama informacija apie transformavimo kreivės patikimumą ir leidžia apskaičiuoti pusėjimo trukmės verčių pasikliovimo ribas (jei reakcija atitinka pseudopirmojo laipsnio kinetiką) arba  $DT_{50}$  vertes ir, jei tinka,  $DT_{75}$  ir  $DT_{90}$  vertes.

## 1.8. BANDYMO METODO APRAŠYMAS

### 1.8.1. Įranga ir cheminiai reagentai

Inkubavimo sistemas sudaro statinės uždaros sistemos arba tinkamos pratekėjimo sistemos (7) (17). Tinkami pratekėjimo ir biometrinio tipo dirvožemio inkubavimo aparatai pavaizduoti 1 ir 2 paveiksluose. Kiekviena iš inkubavimo sistemų turi savo pranašumų ir trūkumų (7) (17).

Reikalinga tipinė laboratorinė įranga, visų pirma ši:

- analizės prietaisai, pvz., dujų ir skysčių chromatografijos (GLC), efektyviosios skysčių chromatografijos (HPLC), plonasluoksnės chromatografijos (TLC) įranga, įskaitant atitinkamas aptikimo sistemas pažymėtosioms arba nepažymėtosioms medžiagoms analizuoti, arba atvirkštinio izotopų skiedimo metodas,
- identifikavimui skirti prietaisai (pvz., MS, GC-MS, HPLC-MS, MBR ir t. t.),
- skysčių scintiliacinis skaitiklis,
- aparatūra radioaktyviosioms medžiagoms oksiduoti,
- centrifuga,
- ekstrahavimo aparatūra (pvz., centrifugos mėgintuvėliai žematemperatūriam ekstrahavimui ir Soksleto aparatas nepertraukiamam ekstrahavimui su grįžtamoju šaldytuvu),
- įranga tirpalams ir ekstraktams koncentruoti (pvz., sukamasis garintuvas),

- vandens vonia,
- mechaninio maišymo įtaisas (pvz., tešlos maišytuvas, sukamasis maišytuvas).

Naudojami cheminiai reagentai, pvz.:

- NaOH, analiziškai grynas, 2 mol dm<sup>-3</sup>, arba kitas tinkamas šarmas (pvz., KOH, etanolaminas),
- H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, analiziškai gryna, 0,05 mol dm<sup>-3</sup>,
- 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 pridama 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 dumbliu arba dirbant žemės ūkio darbus, bandomoji medžiaga iš pradžių turi būti dedama į dumblą, kuris vėliau įterpiamas į dirvožemio ėminį (žr. 1.9.2 ir 1.9.3 skirsnius).

Nerekomenduojama sistemingai naudoti preparatus. Tačiau, pvz., jei bandomoji medžiaga mažai tirpi, preparatų naudojimas gali būti tinkamas pakaitinis būdas.

### 1.8.3. Dirvožemiai

#### 1.8.3.1. Dirvožemio atranka

Transformavimo keliui nustatyti galima naudoti tipinį dirvožemį; rekomenduojama naudoti smėlingą priemolį, dulkišką priemolį, priemolį arba priesmėlį (pagal FAO ir USDA klasifikaciją (18)), kurio pH vertė 5,5– 8,0, organinės anglies kiekis 0,5– 2,5 % ir mikrobinė biomasė sudaro bent 1 % bendrosios organinės anglies (10).

Transformavimo greičiui tirti turi būti naudojami mažiausiai trys papildomi dirvožemiai, sudarantys atitinkamų dirvožemių intervalą. Dirvožemiai turi skirtis organinės anglies kiekiu, pH, molio ir mikrobinės biomasės kiekiu (10).

Visi dirvožemiai apibūdinami, nurodant bent tekstūrą (% smėlio, % dumblo, % molio) (pagal FAO ir USDA klasifikaciją (18)), pH, katijonų mainų gebą, organinės anglies kiekį, tūrinį tankį, vandens sulaikymo charakteristikas (1) ir mikrobinę biomasę (tik aerobiniams tyrimams). Rezultatams aiškinti gali būti naudinga papildoma informacija apie dirvožemio savybes. Dirvožemio charakteristikoms nustatyti gali būti taikomi metodai, rekomenduojami nuorodose (19)(20)(21)(22)(23). Mikrobinė biomasė turi būti nustatoma taikant substrato sukeliama kvėpavimo (SIR) metodą (25)(26) arba pakaitinius metodus (20).

(1) Vandens sulaikymo charakteristikos gali būti matuojamos, kaip lauko drėgmės imlumas, kaip vandens sulaikymo geba arba kaip vandens siurbimo įtempis (hidraulinis potencialas) (pF). Aiškinimai pateikti 1 priedėlyje. Bandymo ataskaitoje turi būti nurodyta, ar dirvožemių vandens sulaikymo charakteristikos ir tūriniai tankiai buvo matuojami nepalietuose lauko ėminiuose, ar palietuose (apdorotuose) ėminiuose.

### 1.8.3.2. *Dirvožemių ėminių ėmimas, tvarkymas ir laikymas*

Reikia turėti detalios informacijos apie lauko vietą, iš kurios imamas bandymo dirvožemis. Nurodoma tiksliai padėtis, augalų danga, apdorojimas cheminėmis medžiagomis, apdorojimas organinėmis ir neorganinėmis trąšomis, biologinių priedų dėjimas arba kiti teršalai. Jei per paskutinius ketverius metus dirvožemiai buvo apdorojami bandomąja medžiaga arba jos struktūriniais analogais, tokie dirvožemiai neturi būti naudojami transformavimo tyrimams (10) (15).

Dirvožemis turi būti tik ką paimtas iš lauko (iš A horizonto arba viršutinio 20 cm sluoksnio), dirvožemiui turint tokį vandens kiekį, kuris lengvintų siojimą. Reikia vengti imti dirvožemių, išskyrus ryžių laukų dirvožemių, ėminius esant ilgalaikiam (ilgesniam kaip 30 parų) sausros, šalčių arba patvinimo laikotarpiui arba iš karto jam pasibaigus (14). Ėminiai turi būti transportuojami tokiu būdu, kad kiek įmanoma mažiau pasikeistų vandens kiekis dirvožemyje, ėminiai turi būti laikomi tamsoje, esant kiek įmanoma didesniam gryno oro kiekiui. Paprastai šiam tikslui tinka nesandariai užrištas polietileninis maišas.

Dirvožemis, paėmus jo ėminius, turi būti apdorotas kiek įmanoma greičiau. Augmenija, didesnė dirvožemio fauna ir akmenys turi būti pašalinti prieš siojant dirvožemį per 2 mm sietą, ant kurio lieka maži akmenys, fauna ir augalų likučiai. Prieš siojant 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  $4 \pm 2$  °C) (1). Išsamūs nurodymai, kaip imti, tvarkyti ir laikyti biologinio transformavimo bandymams skirtus dirvožemių ėminius, pateikti (8) (10) (15) (26) (27).

Prieš apdorotą dirvožemį naudojant šiam bandymui, jam taikomas pradinis inkubavimas, kad galėtų sudygti ir būtų pašalintos sėklos ir būtų atkurta mikrobines medžiagų apykaitos pusiausvyra, kai ėminių ėmimo arba laikymo sąlygas pakeičia inkubavimo sąlygos. Paprastai pakanka 2–28 parų trukmės pradinio inkubavimo laikotarpio, siekiant temperatūros ir drėgmės sąlygas priartinti prie tikrojo bandymo sąlygų (15). Laikymo ir pradinio inkubavimo trukmė kartu neturi būti ilgesnė kaip trys mėnesiai.

## 1.9. BANDYMO PROCEDŪRA

### 1.9.1. **Bandymo sąlygos**

#### 1.9.1.1. *Bandymo temperatūra*

Visą bandymo laikotarpį dirvožemiai inkubuojami tamsoje esant pastoviai temperatūrai, kuri atitiktų klimatinės naudojimo arba išmetimo sąlygas. Rekomenduojama  $20 \pm 2$  °C temperatūra visoms bandomosioms medžiagoms, kurios gali pasiekti dirvožemį vidutinio klimato sąlygomis. Temperatūra turi būti kontroliuojama.

Jei cheminės medžiagos naudojamos arba išmetamos šaltesnio klimato sąlygomis (pvz., šiaurės šalyse, rudens ir žiemos laikotarpiu), papildomi dirvožemio ėminiai inkubuojami esant žemesnei temperatūrai (pvz.,  $10 \pm 2$  °C).

#### 1.9.1.2. *Drėgmės kiekis*

Atliekant transformavimo bandymus aerobinėmis sąlygomis, turi būti nustatomas ir palaikomas dirvožemio drėgmės kiekis (2), atitinkantis pF nuo 2,0 iki 2,5 (3). Dirvožemio drėgmės kiekis išreiškiamas vandens mase sauso dirvožemio masės vienetui, ir turi būti reguliariai tikrinamas (pvz., kas 2 savaites) pasveriant inkubavimo kolbas, o vandens nuostoliai kompensuojami įpilant vandens (pageidautina filtravimu sterilizuoto vandentiekio vandens). Reikia imtis atsargumo priemonių, kad pilant vandenį būtų išvengta bandomosios medžiagos ir (arba) transformavimo produktų nuostolių dėl garavimo ir (arba) fotodestrukcijos (jei vyksta) arba jie būtų kiek įmanoma sumažinti.

Atliekant transformavimo bandymus anaerobinėmis ir ryžių lauko sąlygomis, dirvožemis yra prisotinamas vandeniu užtvindant.

(1) Naujų tyrimų rezultatai rodo, kad vidutinio klimato zonų dirvožemiai irgi gali būti laikomi esant  $-20$  C ilgiau kaip tris mėnesius (28)(29) ir per daug neprarasti mikrobiniio aktyvumo.

(2) Dirvožemis neturi būti per drėgnas arba per sausas, kad būtų galima užtikrinti tinkamą dirvožemio mikrofloros aeravimą ir mitybą. Optimaliam mikrobų augimui rekomenduojamas drėgmės kiekis sudaro 40–60 % vandens sulaikymo gebos (WHC) ir 0,1–0,33 bar (6). Pastarasis intervalas atitinka pF intervalą 2,0–2,5. Tipinis įvairių tipų dirvožemių drėgmės kiekis pateiktas 2 priedėlyje.



1.9.1.3. *Aerobinės inkubavimo sąlygos*

Pratekėjimo sistemose aerobinės sąlygos užtikrinamos tarpais pučiant arba ištaisai per sistemą ventiliuojant sudrėkintą orą. Biometrinėse kolbose oro mainai užtikrinami difuzijos būdu.

1.9.1.4. *Sterilios aerobinės sąlygos*

Informacijai apie abiotinio bandomosios medžiagos transformavimo svarbą gauti, dirvožemio éminiai 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 tiriama ryžių laukų dirvožemis, dirvožemis ir vanduo sterilizuojami ir inkubavimas vykdomas kaip aprašyta 1.9.1.6 skirsnyje.

1.9.1.5. *Anaerobinės inkubavimo sąlygos*

Anaerobinėms sąlygoms sudaryti ir palaikyti, dirvožemis apdorojamas bandomąja medžiaga ir aerobinėms 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) <sup>(1)</sup> Bandomoji sistema turi užtikrinti sąlygas matuoti pvz., pH vertę, deguonies koncentraciją ir oksidacijos-redukcijos potencialą, ir turėti lakiųjų produktų gaudyklę. Sistema turi būti uždara, kad būtų išvengta oro patekimo difuzijos būdu.

1.9.1.6. *Ryžių laukų dirvožemio inkubavimo sąlygos*

Transformavimui ryžių laukų dirvožemiuose tirti dirvožemis užpilamas maždaug 1–5 cm vandens sluoksniu ir bandomoji medžiaga dedama į vandeninę fazę (9). Rekomenduojama naudoti mažiausiai 5 cm gylio dirvožemio sluoksnį. Sistema vėdinama oru, kaip aerobinėms sąlygomis. Turi būti kontroliuojama ir pateikiama ataskaitoje vandeninio sluoksnio pH vertė, deguonies koncentracija ir oksidacijos-redukcijos potencialas. Prieš pradendant transformavimo tyrimus būtinas mažiausiai dviejų savaičių pradinio inkubavimo laikotarpis (žr. 1.8.3.2 skirsnį).

1.9.1.7. *Bandyto trukmė*

Transformavimo greičio ir kelio tyrimai paprastai neturėtų trukti ilgiau kaip 120 parų <sup>(2)</sup> (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 transformavimo produktų susidarymą ir išnykimą, tyrimai gali būti tęsiami ilgesnį laiką (pvz., 6 arba 12 mėnesių) (8). Ilgesni inkubavimo laikotarpiai turi būti pagrįsti bandymo ataskaitoje, be to, papildyti biomasės matavimais šiais laikotarpiais ir jiems pasibaigus.

1.9.2. **Bandyto procedūra**

Maždaug 50–200 g dirvožemio (kaip sauso dirvožemio) dedama į kiekvieną inkubavimo kolbą (žr. 3 priedėlio 1 ir 2 paveikslus) ir dirvožemis apdorojamas bandomąja medžiaga vienu iš metodų, aprašytų 1.8.2 skirsnyje. Jei bandomajai medžiagai įterpti naudojami organiniai tirpikliai, jie turi būti išgarinti iš dirvožemio. Tuomet dirvožemis gerai sumaišomas mentele ir (arba) purtant kolbą. Jei tyrimas daromas ryžių lauko sąlygomis, dirvožemis ir vanduo turi būti gerai sumaišyti po bandomosios medžiagos įterpimo. Daroma mažų alikvotinių apdoroto dirvožemio dalių (pvz., 1 g) analizė bandomajai medžiagai nustatyti ir taip patikrinti pasiskirstymo tolygumą. Pakaitiniai metodai pateikti toliau.

Apdorojimo norma turi atitikti didžiausią augalų apsaugos produkto normą, rekomenduojamą naudojimo instrukcijoje, ir atitinkamą tolygaus įterpimo lauke gylį (pvz., į viršutinį 10 cm dirvožemio sluoksnį <sup>(3)</sup>). 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 instrukcijoje apibrėžtas įterpimo gylis. Jei tai bendrosios paskirties cheminės medžiagos, įterpimo norma turi būti įvertinta atsižvelgiant į patį tipiškiausią patekimo būdą; pvz., kai pagrindinis

<sup>(1)</sup> 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.

<sup>(2)</sup> 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. Bandydas gali būti baigtas po 120 parų arba kai produktais virsta mažiausiai 90 % bandomosios medžiagos, tačiau turi sudaryti mažiausiai 5 % CO<sub>2</sub>.

<sup>(3)</sup> Pradinė koncentracija pagal plotą apskaičiuojama taikant šią lygtį:

$$C_{\text{dirvožemio}} [\text{mg/kg}_{\text{dirvožemio}}] = \left( \frac{A [\text{kg/ha}] \cdot 10^6 [\text{mg/kg}]}{(|m| \cdot (10^4 [\text{m}^2/\text{ha}]) \cdot (d [\text{kg}_{\text{dirvožemio}}/\text{m}^3]))} \right)$$

$$C_{\text{dirvože}} = \text{pradinė koncentracija dirvožemyje} [\text{mg kg}^{-1}]$$

$$A = \text{įterpimo norma} [\text{kg ha}^{-1}]; 1 = \text{lauko dirvožemio sluoksnio storis} [\text{m}]; d = \text{sauso dirvožemio tūrinis tankis} [\text{kg m}^{-3}]$$

Paprastai, esant 1 kg ha<sup>-1</sup> įterpimo normai, koncentracija 10 cm dirvožemio sluoksnyje maždaug lygi 1 mg kg<sup>-1</sup> (darant prielaidą, kad tūrinis tankis yra lygus 1 g cm<sup>-3</sup>).

patekimo į dirvožemį būdas yra nuotekų dumblas, cheminė medžiaga turi būti dozuoama 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 transformavimo produktams identifikuoti, gali būti naudingas atskirų dirvožemio ėminių, turinčių didesnes medžiagos normas, inkubavimas, tačiau reikėtų vengti per didelių normų, darančių įtaką dirvožemio mikrobiniams 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 nepadoroto dirvožemio ėminiai. Šie ėminiai yra naudojami biomasei matuoti vykstant bandymui ir jam pasibaigus.

Kai į dirvožemį įterpiama organiniame (-iuose) tirpiklyje (-iuose) ištirpinta bandomoji medžiaga, dirvožemio ėminiai, apdoroti tokiu pačiu tirpiklio (-ų) kiekiu, inkubuojami tokiomis pačiomis sąlygomis (aerobinėmis), kaip ir bandomąja medžiaga apdoroti ėminiai. Šie ėminiai naudojami biomasei nustatyti tyrimų pradžioje, tyrimų metu ir juos užbaigus, kad būtų galima patikrinti tirpiklio (-ų) poveikį mikrobinei biomasei.

Kolbos su apdorotu dirvožemiu prijungiamos prie matavimo pratekėjimo sąlygomis sistemos, aprašytos 1 paveiksle, arba uždaromos, naudojant 2 paveiksle pavaizduotą sugėrimo kolonėlę (žr. 3 priedėlį).

### 1.9.3. Mėginių ėmimas ir matavimas

Praėjus tam tikram laiko tarpui, paimamos dvi inkubavimo kolbos, dirvožemio mėginiai ekstrahuojami skirtingo poliškumo tirpikliais ir analizuojami bandomajai medžiagai ir (arba) transformavimo produktams nustatyti. Darant gerai suplanuotą tyrimą, naudojamas pakankamas kolbų skaičius, kad kiekvienam mėginio ėmimui būtų galima paaukoti dvi kolbas. Be to, visą kiekvieno dirvožemio inkubavimo laikotarpį ir jam pasibaigus įvairiais laiko intervalais imami sugėrimui naudotų tirpalų arba kietųjų medžiagų mėginiai (pirmąjį mėnesį 7 parų intervalai ir vėliau 17 parų intervalai) ir atliekama jų analizė lakiesiems produktams nustatyti. Be dirvožemio mėginio, imamo iš karto po medžiagos įterpimo (0 paros mėginio), būtina papildomai imti mėginį mažiausiai 5 kartus. Laiko intervalai turi būti pasirinkti taip, kad būtų galima gauti bandomosios medžiagos išnykimo ir transformavimo produktų susidarymo bei išnykimo kreives (pvz., 0, 1, 3, 7 paros; 2, 3 savaitės; 1, 2, 3 mėnesiai ir t. t.).

Kai naudojama  $^{14}\text{C}$  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 analizuojamas kartu bandomajai medžiagai ir transformavimo produktams nustatyti arba prieš ekstrahavimą ir analizę atskiriamas filtravimu ar centrifugavimu.

### 1.9.4. Neprivalomi bandymai

Norint įvertinti temperatūros ir dirvožemio drėgmės įtaką bandomosios medžiagos ir (arba) jos transformavimo produktų transformavimo dirvožemyje greičiams, gali būti naudingi aerobiniai tyrimai nesterilomis sąlygomis, esant papildomoms temperatūros ir dirvožemio drėgmės vertėms.

Galima papildomai pamėginti apibūdinti neekstrahuojamų medžiagų radioaktyvumą, pvz., ekstrahavimui naudojant virškritinę takiją terpę.

## 2. DUOMENYS

### 2.1. REZULTATŲ APDOROJIMAS

Bandomosios medžiagos, transformavimo produktų, lakiųjų medžiagų (tik %) ir neekstrahuojamų medžiagų kiekiai pateikiami kaip pradinės koncentracijos procentinė dalis ir, jei tinka,  $\text{mg kg}^{-1}$  dirvožemio (sausjo dirvožemio masė) kiekvienam mėginio ėmimo intervalui. Masių balansas kiekvienam mėginio ėmimo intervalui turi būti pateiktas kaip naudotos pradinės koncentracijos procentinė dalis. Grafiškai pavaizdavus bandomosios medžiagos koncentracijos verčių ir laiko santykį, bus galima įvertinti jos transformavimo pusėjimo trukmę arba  $\text{DT}_{50}$ . Turi

būti identifikuoti pagrindiniai transformavimo produktai ir brėžiamas jų koncentracijos verčių kitimo laike grafikas susidarymo ir išnykimo greičiams parodyti. Pagrindiniu transformavimo produktu laikomas kiekvienas produktas, kuris bet kuriuo tyrimo metu sudaro  $\geq 10\%$  naudotos dozės.

Absorbuoti lakieji produktai tam tikru laipsniu rodo dirvožemyje esančios bandomosios medžiagos ir jos transformavimo produktų lakumą.

Tiksliu pusėjimo trukmės arba  $DT_{50}$  vertės ir, jei tinka,  $DT_{75}$  ir  $DT_{90}$  vertės nustatomos taikant atitinkamus kinetinių modelių apskaičiavimus. Pusėjimo trukmės ir  $DT_{50}$  vertės pateikiamos ataskaitoje kartu su taikyto modelio aprašymu, kinetikos laipsniu ir nustatymo koeficientu ( $r^2$ ). Geriau taikyti pirmojo laipsnio kinetiką, išskyrus kai  $r^2 < 0,7$ . Be to, jei reikia, atliekami pagrindinių transformavimo produktų apskaičiavimai. Atitinkami modelių pavyzdžiai aprašyti 31–35 nuorodose.

Darant transformavimo greičio tyrimus, esant įvairioms temperatūros vertėms, transformavimo greičiai turi būti aprašyti kaip temperatūros funkcija bandymo temperatūros verčių intervale, taikant tokią Arenijaus lygtį:

$$k = A \cdot e^{-B/T} \text{ arba } \ln k = \ln A - \left( \frac{B}{T} \right)$$

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 transformavimą valdo mikrobu veikimas.

## 2.2. REZULTATŲ ĮVERTINIMAS IR AIŠKINIMAS

Nors tyrimas atliekamas dirbtinėje laboratorinėje sistemoje, rezultatai leis įvertinti bandomosios medžiagos transformavimo greitį ir transformavimo produktų susidarymo bei išnykimo greitį lauko sąlygomis (36)(37).

Bandomosios medžiagos transformavimo kelio tyrimas suteikia informacijos apie tai, kaip dirvožemyje pasikeičia įterptosios medžiagos struktūra, vykstant cheminėms ir mikrobinėms reakcijoms.

## 3. ATASKAITA

### BANDYMO ATASKAITA

Bandymo ataskaitoje turi būti ši informacija:

Bandomoji medžiaga:

- bendrinis pavadinimas, cheminis pavadinimas, CAS numeris, struktūrinė formulė (rodanti žymėtojo (-ųjų) atomo (-ų) padėtį, jei naudojama žymėtoji medžiaga) ir atitinkamos fizikinės ir cheminės savybės (žr. 1.5 skirsnį),
- bandomosios medžiagos grynumas (priemaišos),
- radiocheminis žymėtosios cheminės medžiagos grynumas ir savitasis aktyvumas (jei tinka).

Etaloninės medžiagos:

- etaloninių medžiagų, naudojamų transformavimo produktui apibūdinti ir (arba) identifikuoti, cheminis pavadinimas ir struktūra.

Bandomieji dirvožemiai:

- ėmimo vietos detalės,

- dirvožemių ėmimo data ir metodika,
- dirvožemių savybės, pvz., pH vertė, organinės anglies kiekis, tekstūra (% smėlio, % dulkių, % molio), kationų mainų geba, tūrinis tankis, vandens sulaikymo charakteristika ir mikrobinė biomasė,
- dirvožemio laikymo trukmė ir sąlygos (jei laikomas).

Bandymo sąlygos:

- tyrimų datos,
- įterptos bandomosios medžiagos kiekis,
- naudoti tirpikliai ir bandomosios medžiagos įterpimo būdas,
- iš pradžių apdoroto dirvožemio ir kiekvienai analizei imamo dirvožemio masė,
- naudotos inkubavimo sistemos aprašymas,
- oro srauto vertės (tik pratekėjimo sistemoms),
- temperatūra bandymo pradžioje,
- dirvožemio drėgmės kiekis inkubavimo metu,
- mikrobinė masė aerobinių tyrimų pradžioje, jų eigoje ir pabaigoje,
- pH vertė, deguonies koncentracija ir oksidacijos-redukcijos potencialas anaerobinių ir ryžių laukų tyrimų pradžioje, jų eigoje ir pabaigoje,
- ekstrahavimo metodas (-ai),
- bandomosios medžiagos, pagrindinių jos transformavimo dirvožemyje produktų bei sugertų medžiagų kiekybinio nustatymo ir identifikavimo metodai,
- kartotinių ir kontrolinių ėminių skaičius.

Rezultatai:

- mikrobinio aktyvumo nustatymo rezultatai,
- taikytų analizės metodų pakartojamumas ir jautrumas,
- regeneravimo laipsnio vertės (tinkamu patvirtinto tyrimo % vertės yra pateiktos 1.7.1 skirsnyje),
- rezultatų, išreiškiamų kaip įterptos pradinės dozės procentinė dalis ir, jei tinka, kaip  $\text{mg kg}^{-1}$  dirvožemio (sauso dirvožemio), lentelės,
- masių balansas tyrimų eigoje ir juos užbaigus,
- dirvožemio neekstrahuojamo (surištojo) radioaktyvumo arba likučių apibūdinimas,
- išsiskyrusio  $\text{CO}_2$  ir kitų lakiųjų medžiagų kiekybinis apskaičiavimas,

- bandomosios medžiagos ir, jei tinka, pagrindinių transformavimo produktų koncentracijos dirvožemyje kaip laiko funkcijos kreivės,
- bandomosios medžiagos ir, jei tinka, pagrindinių transformavimo produktų pusėjimo arba  $DT_{50}$ ,  $DT_{75}$  ir  $DT_{90}$  vertės, įskaitant pasiklovimo ribas,
- abiotinio skilimo steriliomis sąlygomis greičio įvertis,
- bandomosios medžiagos ir, jei tinka, pagrindinių transformavimo produktų transformavimo kinetikos įvertinimas,
- pasiūlyti transformavimo keliai, jei tinka,
- rezultatų aptarimas ir aiškinimas,
- neapdoroti duomenys (t. y. ėminių chromatogramos, transformavimo greičio apskaičiavimų pavyzdžiai ir transformavimo produktams identifikuoti naudotos priemonės).

#### 4. NUORODOS

- 1) US- Environmental Protection Agency (1982). Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental Fate.
- 2) Agriculture Canada (1987). Environmental Chemistry and Fate. Guidelines for registration of pesticides in Canada.
- 3) European Union (ES) (1995). Commission Directive 95/36/EC of 14 July 1995 amending Council Directive 91/414/EEC concerning the placing of plant protection products on the market. Annex II, Part A and Annex III, Part A: Fate and Behaviour in the Environment.
- 4) Dutch Commission for Registration of Pesticides (1995). Application for registration of a pesticide. Section G: Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.
- 5) BBA (1986). Richtlinie 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)
- 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 16<sup>th</sup> 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 Diallyl im Boden. *Z. PflKrankh Pflschutz, Sonderheft VII*, 141–146.

- 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) Hurler K., Walker A. (1980). Persistence and its prediction. In Interactions between Herbicides and the Soil (R.J. Hance, Ed.), Academic Press, 83–122.

## 1 priedėlis

VANDENS ĮTEMPTIS (HIDRAULINIS POTENCIALAS), LAUKO DRĖGMĖS IMLUMAS (FC) IR VANDENS SULAIKYMO GĖBA (WHC) <sup>(1)</sup>

Vandens stulpelio aukštis (cm)	pF <sup>(a)</sup>	bar <sup>(b)</sup>	Pastabos
10 <sup>7</sup>	7	10 <sup>4</sup>	Sausas dirvožemis
1,6 × 10 <sup>4</sup>	4,2	16	Augalų vytimo taškas
10 <sup>4</sup>	4	10	
10 <sup>3</sup>	3	1	
6 × 10 <sup>2</sup>	2,8	0,6	
3,3 × 10 <sup>2</sup>	2,5	} 0,33 <sup>(c)</sup>	Lauko drėgmės imlumo intervalas <sup>(d)</sup>
10 <sup>2</sup>	2		
60	1,8		
33	1,5		
10	1	0,01	WHC (apytikrė vertė)
1	0	0,001	Vandeniui prisotintas dirvožemis

<sup>(a)</sup> pF = vandens stulpelio aukščio, išreikšto cm, logaritmas.

<sup>(b)</sup> 1 bar = 10<sup>5</sup> Pa.

<sup>(c)</sup> Atitinka apytikrų vandens kiekį 10 % smėlyje, 35 % priemolyje ir 45 % molyje.

<sup>(d)</sup> Lauko drėgmės imlumas nėra pastovus dydis, bet atsižvelgiant į dirvožemio tipą kinta nuo F 1,5 iki 2,5.

Vandens įtemptis matuojama vandens stulpelio aukščio cm arba bar. Dėl didelio siurbimo įtempties intervalo ji išreiškiama tiesiog kaip pF vertė, kuri atitinka vandens stulpelio aukščio, išreikšto cm, logaritmą.

Lauko drėgmės imlumas apibrėžiamas kaip vandens kiekis, kurį veikiant sunkio jėgai gali sulaikyti natūralus dirvožemis 2 paras po ilgesnio lietaus laikotarpio arba po pakankamo drėkinimo. Jis nustatomas nepalietam dirvožemiui *in situ* lauke. Taigi matavimas netaikomas paliesto dirvožemio laboratoriniams ėminiams. FC vertės, nustatytos paliestam dirvožemiui, gali turėti didelių sistemingų nuokrypių.

Vandens sulaikymo gėba (WHC) nustatoma laboratorijoje nepalietam ir paliestam dirvožemiui, dirvožemį kolonėlėje sotinant kapiliarais kylančiu vandeniu. Ji yra ypač naudinga apibrėžiant paliestą dirvožemį ir gali būti iki 30 % didesnė už lauko drėgmės imlumą (1). Be to, ją bandymo keliu lengviau nustatyti nei patikimas FC vertes.

## Pastabos

<sup>(1)</sup> Mückenhausen, E. (1975). Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen. DLG-Verlag, Frankfurt, Main.



## 2 priedėlis

**DRĖGMĖS KIEKIS (g vandens 100 g sauso dirvožemio) ĮVAIRIŲ ŠALIŲ ĮVAIRIAUS TIPO DIRVOŽEMYJE**

Dirvožemio tipas	Šalis	Drėgmės kiekis, kai		
		WHC <sup>(1)</sup>	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

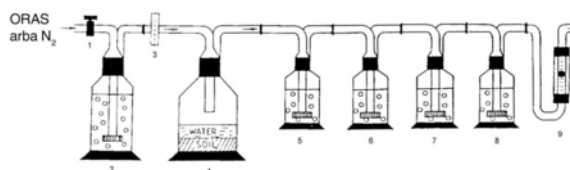
<sup>(1)</sup> Vandens sulaikymo geba (WHC – Water Holding Capacity).

## 3 priedėlis

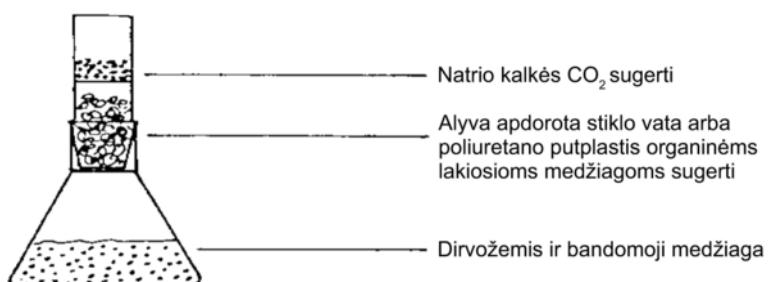
## 1 paveikslas

Pratekėjimo aparato cheminių medžiagų virsmui dirvožemyje tirti pavyzdys <sup>(1)</sup>, <sup>(2)</sup>

- |  |   |   |
|--|---|---|
| 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  | 5: lakiųjų organinių junginių gaudyklė, užpildyta etilenglikoliu  | 7, 8: CO <sub>2</sub> ir kitų rūgštinių medžiagų gaudyklė, užpildyta natrio šarmu |
| 3: ultrafiltravimo membrana (tik taikant sterilias sąlygas), akucių dydis 0,2 μm | 9: srautmetis.  |   |



## 2 paveikslas

Biometrinio tipo kolbos cheminių medžiagų virsmui dirvožemyje tirti pavyzdys <sup>(3)</sup>

<sup>(1)</sup> Guth, J.A. (1980). The study of transformations. In Interactions between Herbicides and the Soil (R.J. Hance, Ed.), Academic Press, 123–157.

<sup>(2)</sup> 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.

<sup>(3)</sup> 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.

## C.24. AEROBINIS IR ANAEROBINIS TRANSFORMAVIMAS VANDENS TELKINIŲ DUGNO NUOSĖDŲ SISTEMOSE

### 1. METODAS

Šis bandymo metodas atitinka OECD TG 308 (2002).

#### 1.1. ĮVADAS

Cheminės medžiagos gali patekti į negilius arba gilius paviršinius vandenį pvz., šiais būdais: tiesioginio pridėjimo, purškiamų medžiagų sklaidos, nuotėkio, drenažo, atliekų šalinimo, pramoninių, buitinių arba žemės ūkio nuotėkų ir nusėdimo iš atmosferos. Šiame bandymo metode aprašytas laboratorinis metodas skirtas įvertinti organinių cheminių medžiagų aerobinį ir anaerobinį transformavimą vandens telkinių dugno nuosėdų sistemose. Jis yra pagrįstas turimomis rekomendacijomis (1) (2) (3) (4) (5) (6). Belgirate, Italijoje, 1995 m. vykusiame OECD seminare dėl dirvožemių ir nuosėdinių uolienu atrankos (7) buvo konkrečiai sutarta dėl šiamo bandyme naudojamų dirvožemių skaičiaus ir tipo. Be to, seminare buvo pateiktos dirvožemio ėminių ėmimo, tvarkymo ir laikymo rekomendacijos, pagrįstos ISO rekomendaciniu dokumentu (8). Tokie tyrimai skirti cheminėms medžiagoms, kurios tiesiogiai dedamos į vandenį arba kurios gali pasiekti vandeninę aplinką pirmiau aprašytais būdais.

Gamtinių vandens telkinių dugno nuosėdų sistemų sąlygos dažnai yra aerobinės viršutinėje vandeninėje fazėje. Nuosėdų paviršiniame sluoksnyje sąlygos gali būti aerobinės arba anaerobinės, o giliau esančiose nuosėdose jos paprastai yra anaerobinės. Siekiant aprėpti visas šias galimybes, šiame dokumente aprašyti aerobiniai ir anaerobiniai bandymai. Atliekant aerobinį bandymą, modeliuojamas aerobinio vandens stulpas virš aerobinių nuosėdų, po kuriomis yra sluoksnis su anaerobinių sąlygų gradientu. Atliekant anaerobinį bandymą modeliuojama visiškai anaerobinė vandens ir nuosėdų sistema. Jei aplinkybės rodo, kad būtina labai nukrypti nuo šių rekomendacijų, pvz., naudojant nepalietusių nuosėdų kernus arba nuosėdas, kurios galėjo būti veikiamos bandomąja medžiaga, šiam tikslui yra kiti skirti metodai (9).

#### 1.2. APIBRĖŽTYS

Visai atvejais turi būti naudojami tarptautinės vienetų sistemos (SI) vienetai.

**Bandomoji medžiaga** – bet kuri medžiaga (tai gali būti pradinis junginys ar medžiagos transformavimo produktai)

**Transformavimo produktai** – visos medžiagos, susidarancios vykstant bandomosios medžiagos biotinio arba abiotinio transformavimo reakcijoms, įskaitant CO<sub>2</sub> 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, surišųjų likučių susidarymas labai mažina biologinį įsisavinamumą ir biologinį kaupimąsi (10) (modifikuota IUPAC 1984 (11) apibrėžtis).

**Aerobinis transformavimas (oksidavimas)** – reakcijos, vykstančios esant molekuliniam deguoniui (12).

**Anaerobinis transformavimas (dezoksidavimas)** – reakcijos, vykstančios nesant molekulinio deguonies (12).

**Gamtiniai vandenys** – paviršiniai vandenys, paimti iš tvenkinių, upių, upelių ir t. t.

**Nuosėdos:** – mineralinių ir organinių komponentų mišinys, kurio organinius komponentus sudaro didelės molekulinės masės junginiai, turintys didelį anglies ir azoto kiekį. Jis nusodina gamtinis vanduo, su kuriuo nuosėdos sudaro sąlyčio paviršių.

**Mineralizacija:** – visiškas organinio junginio skilimas į CO<sub>2</sub> ir H<sub>2</sub>O aerobinėmis sąlygomis, ir į CH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub> ir H<sub>2</sub>O anaerobinėmis sąlygomis. Šiame bandymo metode, kai naudojamas žymėtasis junginys, mineralizacija yra didelio laipsnio molekulinės skilimas, kai žymėtasis anglies atomas kiekybiškai oksiduojamas arba redukuojamas, susidarant atitinkamam <sup>14</sup>C<sub>2</sub>O arba <sup>14</sup>CH<sub>4</sub> kiekiui.

**Pusėjimo trukmė** –  $t_{0,5}$ , laikas, per kurį bandomosios medžiagos koncentracija sumažėja 50 %, kai transformavimui aprašyti tinka pirmojo laipsnio kinetika; ji nepriklauso nuo pradinės koncentracijos.

**DT<sub>50</sub> (išnykimo trukmė 50)** – laikas, per kurį bandomosios medžiagos koncentracija sumažėja 50 %.

**DT<sub>75</sub> (išnykimo trukmė 75)** – laikas, per kurį bandomosios medžiagos koncentracija sumažėja 75 %.

**DT<sub>90</sub> (išnykimo trukmė 90)** – laikas, per kurį bandomosios medžiagos koncentracija sumažėja 90 %.

### 1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Etaloninės medžiagos naudojamos, jei transformavimo produktams identifikuoti ir kiekybiškai nustatyti taikomi spektroskopiniai ir chromatografijos metodai.

### 1.4. INFORMACIJA APIE BANDOMĄJĄ MEDŽIAGĄ

Transformavimo greičiui matuoti gali būti naudojama nežymėtoji arba žymėtųjų atomų turinti bandomoji medžiaga, bet geriau naudoti žymėtąją medžiagą. Žymėtoji medžiaga reikalinga transformavimo keliui tirti ir masių balansui nustatyti. Rekomenduojama žymėti <sup>14</sup>C, bet gali būti naudingi kiti izotopai, pvz., <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N, <sup>3</sup>H, <sup>32</sup>P. Kiek tai įmanoma, žymėtasis atomas turi būti patvariausioje (-iose) molekulės dalyje (-yse) <sup>(1)</sup>. Bandomosios medžiagos cheminis ir (arba) radiocheminis grynumas turi būti mažiausiai 95 %.

Prieš pradėdant 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) adsorbcijos koeficientas ( $K_d$ ,  $K_f$ ,  $K_{oc}$ , jei tinka) (C. 18 metodas);
- f) hidrolizė (C.7 metodas);
- g) disociacijos konstanta ( $pK_a$ ), (OECD TG 112) (13);
- h) bandomosios medžiagos cheminė struktūra ir žymėtųjų izotopų padėtis, jei taikomi.

*Pastaba.* Ataskaitoje turi būti nurodyta matavimų temperatūra.

Kitą naudingą informaciją gali sudaryti duomenys apie bandomosios medžiagos toksinį poveikį mikroorganizmams, duomenys apie lengvą ir (arba) būdingąjį biologinį skaidumą, duomenys apie aerobinį arba anaerobinį transformavimą dirvožemyje.

Reikia turėti analizės metodus (įskaitant ekstrahavimo ir gryninimo metodus) bandomajai medžiagai ir jos transformavimo vandenyje bei nuosėdose produktams identifikuoti ir kiekybiškai nustatyti (žr. 1.7.2 skirsnį).

<sup>(1)</sup> 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.

### 1.5. BANDYMO METODO PRINCIPAS

Pagal šiame bandyme aprašytą metodą naudojamos aerobinė ir anaerobinė vandeninių nuosėdų (žr. 1 priedėlį) sistema, kurioje galima:

- i) matuoti bandomosios medžiagos transformavimo vandens ir nuosėdų sistemoje greitį;
- ii) matuoti bandomosios medžiagos transformavimo nuosėdose greitį;
- iii) matuoti bandomosios medžiagos ir (arba) transformavimo produktų mineralizacijos greitį (kai naudojama  $^{14}\text{C}$  žymėtoji bandomoji medžiaga);
- iv) identifikuoti ir kiekybiškai nustatyti transformavimo vandeninėje ir nuosėdų fazėse produktus, įskaitant masių balansą (kai naudojama žymėtoji bandomoji medžiaga);
- v) matuoti bandomosios medžiagos ir jos transformavimo produktų pasiskirstymą tarp dviejų fazių inkubavimo tamsoje laikotarpiu (siekiant išvengti, pvz., dumblių žydėjimo), esant pastoviai temperatūrai. Nustatomos pusėjimo trukmės,  $DT_{50}$ ,  $DT_{75}$  ir  $DT_{90}$  vertės, kai tai leidžia daryti turimi duomenys, bet jų nereikėtų ekstrapoluoti 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.

### 1.6. BANDYMO TINKAMUMAS

Metodas iš esmės tinka visoms cheminėms medžiagoms (nežymėtosioms arba žymėtosioms), kurioms nustatyti yra sukurtas pakankamo tikslumo ir jautrio analizės metodas. Jis tinka mažai lakiems, nelakiems, vandenyje tirpiems arba netirpiems junginiams. Bandymas neturi būti taikomas cheminėms medžiagoms, kurios labai greit išgaruoja iš vandens (pvz., fumigantai, organiniai tirpikliai), todėl negali būti laikomos vandenyje ir (arba) nuosėdose šio bandymo sąlygomis.

Iki šiol metodas buvo taikomas cheminių medžiagų transformavimui gėlame vandenyje ir nuosėdose tirti, bet iš esmės jį dar galima taikyti upių žiočių ar jūros sistemoms. Jis netinka tekančio vandens (pvz., upių) arba atvirosios jūros sąlygoms modeliuoti.

### 1.7. KOKYBĖS KRITERIJAI

#### 1.7.1. Regeneravimas

Mažiausiai dviejų kartotinių vandens ir nuosėdų ėminių ekstrahavimas ir analizė iškart po bandomosios medžiagos pridėjimo yra pirmasis analizės metodo pakartojamumo ir bandomosios medžiagos įterpimo metodikos tolygumo rodiklis. Vėlesnių bandymo stadijų regeneravimo laipsnis gaunamas matuojant atitinkamų masės verčių balansą (kai naudojama žymėtoji medžiaga). Žymėtųjų cheminių medžiagų regeneravimo laipsnis turi būti nuo 90 % iki 110 % (6), nežymėtųjų cheminių medžiagų – nuo 70 % iki 110 %.

#### 1.7.2. Analizės metodo pakartojamumas ir jautris

Bandomosios medžiagos ir transformavimo produktų kiekybinės analizės metodo pakartojamumas (išskyrus pradinį ekstrahavimo efektyvumą) gali būti patikrintas atliekant kartotinę to paties vandens arba nuosėdų ėminių, inkubuočių pakankamai ilgai, kad galėtų susidaryti transformavimo produktai, ekstrakto analizę.

Bandomosios medžiagos ir transformavimo produktų analizės metodo aptikimo 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. Transformavimo duomenų tikslumas

Atliekant bandomosios medžiagos koncentracijos verčių kaip laiko funkcijos regresinę analizę gaunama atitinkama informacija apie transformavimo kreivės tikslumą ir leidžia apskaičiuoti pusėjimo trukmės verčių pasikliovimo ribas (jei reakcija atitinka pseudopirmojo laipsnio kinetiką) arba  $DT_{50}$  vertes ir, jei tinka,  $DT_{75}$  ir  $DT_{90}$  vertes.

### 1.8. METODO APRAŠYMAS

#### 1.8.1. Bandymo sistema ir aparatūra

Tyrimas turi būti daromas naudojant stiklinius indus (pvz., butelius, centrifugavimo mėgintuvėlius), išskyrus kai išankstinė informacija (pvz., pasiskirstymo koeficientas (n-oktanolis/vanduo), sorbcijos duomenys ir t. t.) rodo, kad bandomoji medžiaga gali sukibti su stiklu; šiam atvejui reikėtų numatyti pakaitinę medžiagą (pvz., tefloną). Jei žinoma, kad bandomoji medžiaga gali sukibti su stiklu, šią problemą būtų galima iš dalies sumažinti, taikant vieną iš šių metodų:

- nustatyti stiklu sorbuotos bandomosios medžiagos ir transformavimo produktų masę,
- užtikrinti, kad baigus bandymą visi stikliniai indai būtų plaunami tirpikliu,
- naudoti produktų preparatus (žr. dar 1.9.2 skirsnį),
- naudoti padidintą antrojo tirpiklio kiekį bandomajai medžiagai į sistemą įvesti; jei naudojamas antrasis tirpiklis, jame neturi tirpti bandomoji medžiaga.

Tipinės bandymo aparatūros pavyzdžiai, t. y. dujų pratekėjimo ir biometrinio tipo sistemos, pavaizduoti atitinkamai 2 ir 3 priedėliuose (14). Kitos tinkamos inkubavimo sistemos aprašytos 15 nuoroje. 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). Ventilaciją galima užtikrinti nestipriai barbotuojant orą arba azotą arba juos leidžiant virš vandens paviršiaus. Pataruoju atveju galima patarti nestipriai maišyti viršutinį vandens sluoksnį, kad deguonis ir azotas geriau pasklistų vandenyje. Neturi būti naudojamas  $CO_2$  neturintis oras, kadangi dėl to gali padidėti vandens pH vertė. Bet kuriuo atveju drumsti nuosėdas nepageidautina ir to turi būti kiek įmanoma vengiama. Mažai lakių cheminės medžiagos turi būti bandomos biometrinio tipo sistemoje, nestipriai maišant vandens paviršinį sluoksnį. Be to, galima naudoti uždarus indus su atmosferiniu oru arba azotu užpildyta laisvąja erdve ir buteliukus viduje lakiesiems produktams sugauti (16). Atliekant aerobinį bandymą reikia reguliariai keisti laisvojoje erdvėje esančias dujas biomasės suvartotam deguoniui kompensuoti.

Tinkamos priemonės lakiems transformavimo produktams sugerti, kurių gali būti ir daugiau, yra 1 mol  $dm^{-3}$  kalio arba natrio hidroksido tirpalas anglies dioksidui sugerti<sup>(1)</sup> ir etilenglikolis, etanolaminas arba 2 % parafino tirpalas ksilene organiniams junginiams sugerti. Anaerobinėms sąlygomis susidariusius lakiuosius produktus, pvz., metaną, galima rinkti, pvz., molekuliniais sietais. Tokie lakieji produktai gali būti sudeginti, pvz., iki  $CO_2$ , leidžiant dujas CuO užpildytu kvarciniu vamzdeliu, kaitinamu iki 900 °C temperatūros, o susidariusį  $CO_2$  sugerti absorberyje šarmo tirpalu (17).

Reikia turėti laboratorinius bandomosios medžiagos ir transformavimo produktų analizės prietaisus (pvz., dujų ir skysčių chromatografijos (GLC), efektyviosios skysčių chromatografijos (HPLC), plonasluoksnės chromatografijos (TLC), masių spektroskopijos (MS), dujų chromatografijos-masių spektroskopijos (GC-MS), skysčių chromatografijos-masių spektroskopijos (LC-MS), magnetinio branduolių rezonanso (MBR) ir t. t. įrangą), atitinkamas aptikimo sistemas žymėtosioms arba nežymėtosioms medžiagoms analizuoti. Be to, reikia turėti skysčių scintiliacinį skaitiklį ir oksidacinio sudeginimo aparatūrą (nuosėdų ėminiams sudeginti prieš radioaktyvumo analizę) žymėtosioms medžiagoms analizuoti.

Būtina turėti kita tipinę laboratorinę įrangą fizikocheminei ir biologinei analizei atlikti (žr. 1.8.2.2 skirsnio lentelę), stiklinius indus, atitinkamas chemines medžiagas ir reagentus.

#### 1.8.2. 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.

<sup>(1)</sup> 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.

## 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) (!) kiekį > 50 %, o „stambi tekstūra“ apibrėžiama kaip turinti (molio + dumblo) kiekį < 50 %. Dviejų rūšių nuosėdų (molio + dumblo) kiekio skirtumas paprastai turi būti ne mažesnis kaip 20 %. Tais atvejais, kai cheminė medžiaga gali pasiekti jūros vandenį, mažiausiai viena iš vandens ir dumblo sistemų turi būti jūrinės kilmės.

Norint atlikti griežtai anaerobinį tyrimą, dviejų rūšių nuosėdos (įskaitant virš jų esantį vandenį) turi būti imamos iš anaerobinių paviršinio vandens tūrio zonų (7). Nuosėdos ir virš jų esančios vandeninės fazės turi būti tvarkomos ir vežamos atsargiai, apsaugant nuo deguonies patekimo.

Pasirenkant nuosėdas gali būti svarbūs kiti parametrai, į kuriuos turi būti atsižvelgta kiekvienu konkrečiu atveju. Pvz., nuosėdų pH verčių intervalas turėtų būti svarbus bandant chemines medžiagas, kurių transformavimas ir (arba) sorbcija gali priklausyti nuo pH vertės. Sorbcijos priklausomybę nuo pH vertės gali rodyti bandomosios medžiagos  $pK_a$  vertė.

## 1.8.2.2. Vandens ir nuosėdų ėminių apibūdinimas

Pagrindiniai vandens ir nuosėdų parametrai, kurie turi būti išmatuoti ir pateikti ataskaitoje (su taikyto metodo nuoroda), ir bandymo stadija, kurioje tie parametrai turi būti nustatyti, yra apibendrinti toliau pateiktoje lentelėje. Informacija apie tų parametrų nustatymo metodus pateikta nuorodose (18)(19)(20)(21).

Be to, kiekvienu konkrečiu atveju gali tekti matuoti ir pateikti ataskaitoje kitus parametrus (pvz., gėlo vandens: daleles, šarmingumą, kietumą, laidį,  $NO_3/PO_4$  (santykį ir atskiras vertes); nuosėdų: katijonų mainų gebą, vandens sulaikymo gebą, karbonatų kiekį, bendrą azoto ir fosforo kiekį; jūros sistemoms: druskingumą). Be to, gali būti naudinga nuosėdų ir vandens analizė nitratams, sulfatams, biologiškai kaupiamos geležies ir kitiems galimiems elektronų akceptoriams nustatyti įvertinant oksidacijos-redukcijos sąlygas, ypač anaerobinio transformavimo atveju.

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
<b>Vanduo</b>						
Kilmė/Šaltinis	x					
Temperatūra	x					
pH	x		x	x	x	x
Bendroji organinė anglis (TOC)			x	x		x
O <sub>2</sub> koncentracija (*)	x		x	x	x	x
Oksidacijos redukcijos potencialas (*)			x	x	x	x

(!) (Molis + dumblas) yra mineralinė dalis nuosėdų, kurių dalelių dydis < 50 μm.

Parametras	Bandymo stadija					
	Ėminio ėmimas-lauke	Vėlesnis tvarkymas	Aklimatizacijos pradžia	Bandymo pradžia	Bandymo eiga	Bandymo pabaiga
<b>Nuosėdos</b>						
Kilmė/Šaltinis	x					
Sluoksnio gylis	x					
pH		x	x	x	x	x
Dalelių dydžio skirstinys		x				
TOC		x	x	x		x
Mikrobinė biomasė (**)		x		x		x
Oksidacijos redukcijos potencialas (*)	Stebėjimas (spalva/kvapas)		x	x	x	x

(\*) Mikrobinio kvėpavimo greičio nustatymo metodas (26), fumigacijos metodas (27) arba mikroorganizmų skaičiavimo metodai (pvz., bakterijų, aktinomicečių, grybelių ir bendro kolonijų skaičiaus), darant aerobinius tyrimus; metano susidarymo greitis, darant anaerobinius tyrimus.

(\*\*) Naujų tyrimų rezultatai parodė, kad vandens deguonies ir oksidacijos-redukcijos potencialo matavimai neturi mechanizmo nustatymo ir prognozavimo vertės, kai kalbama apie mikrobų populiacijos paviršiniuose vandenyse augimą ir vystymąsi (24)(25). Biocheminio deguonies poreikio (BOD, imant ėminį lauke, bandymo pradžioje ir pabaigoje) ir mitybinių mikroelementų/makroelementų Ca, Mg ir Mn vandenyje nustatymas (bandymo pradžioje ir pabaigoje) ir bendro N bei bendro P kiekio nuosėdose matavimas (imant ėminį lauke ir bandymo pabaigoje) gali būti geresnė priemonė aerobinio biologinio virsmo greičiams ir keliams interpretuoti bei įvertinti.

### 1.8.3. Ėminių ėmimas, tvarkymas ir laikymas

#### 1.8.3.1. Ėminių ėmimas

Imant nuosėdas būtina vadovautis ISO rekomendacinio dokumento projektu dėl dugno nuosėdų ėminių ėmimo (8). Nuosėdų ėminiai turi būti imami iš viso viršutinio 5–10 cm storio nuosėdų sluoksnio. Nuosėdas atitinkantis vanduo turi būti imamas iš tos pačios vietos arba vietovės ir tuo pačiu metu, kaip ir nuosėdos. Atliekant anaerobinį tyrimą, nuosėdos ir jas atitinkantis vanduo turi būti imami, apsaugant nuo deguonies patekimo (28) (žr. 1.8.2.1 skirsnį). Kai kurie ėminių ėmimo įtaisai aprašyti literatūroje (8) (23).

#### 1.8.3.2. Tvarkymas

Nuosėdos atskiriamos nuo vandens filtravimu ir šlapios sijoamos per 2 mm sietą, naudojant toje pat vietoje buvusio vandens perteklių, kuris vėliau išpilamas. Tuomet žinomas nuosėdų ir vandens kiekis sumaišomas norimu santykiu (žr. 1.9.1 skirsnį) inkubavimo kolbose ir ruošiamas aklimatizacijai (žr. 1.8.4 skirsnį). Darant anaerobinį tyrimą, visos ruošimo operacijos turi būti vykdomos neleidžiant patekti deguoniui (29) (30) (31) (32) (33).

#### 1.8.3.3. Laikymas

Rekomenduojama naudoti ką tik paruoštas nuosėdas ir vandenį, tačiau jei būtina ėminius laikyti, nuosėdos su vandeniu sijoamos, kaip pirmiau aprašyta, užpilamos vandeniu (6–10 cm vandens sluoksniu) ir laikomos kartu su juo tamsoje ne ilgiau kaip 4 savaites, esant  $4 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$  [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 sistemoms stabilumui pasiekti, kurį rodo pH vertė, deguonies koncentracija vandenyje, nuosėdų ir vandens oksidacijos-redukcijos potencialas ir makroskopinis faziųatsiskyrimas. 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 PROCEDŪRA

### 1.9.1. **Bandymo sąlygos**

Bandymas turi būti atliekamas inkubavimo aparate (žr. 1.8.1 skirsnį), esant vandens ir nuosėdų tūrio santykiui nuo 3: 1 iki 4: 1, ir 2,5 cm ( $\pm$  0,5 cm) nuosėdų sluoksnio storiui. <sup>(1)</sup> Rekomenduojama naudoti ne mažiau kaip 50 g nuosėdų (skaičiuojant sausai medžiagai) vienam inkubavimo indui.

Bandymas turi būti atliekamas tamsoje esant pastoviai 10–30 °C temperatūrai. Tikslinga naudoti (20  $\pm$  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.

### 1.9.2. **Bandomosios medžiagos apdorojimas ir įdėjimas**

Naudojama viena cheminės medžiagos bandymo koncentracija <sup>(2)</sup>. Augalų apsaugai skirtoms cheminėms medžiagoms, kurios tiesiogiai pilamos į vandens telkinius, didžiausia etiketėje nurodyta dozavimo koncentracija turi būti laikoma didžiausia taikoma norma, apskaičiuojama pagal bandymo indo vandens paviršiaus plotą. Visais kitais atvejais naudojama koncentracija turi būti pagrįsta į aplinką išmetamo kiekio įverčiais. Būtina užtikrinti, kad būtų naudojama atitinkama bandomosios medžiagos koncentracija, siekiant apibūdinti transformavimo kelią ir transformavimo produktų susidarymą ir išnykimą. Gali tekti naudoti didesnes dozes (pvz., 10 kartų) tais atvejais, kai bandomosios medžiagos koncentracijos vertės bandymo pradžioje yra arti aptikimo ribos ir (arba) jei pagrindiniai transformavimo produktai negali būti lengvai rasti, kai jie sudaro 10 % bandomosios medžiagos įdėjimo normos. Tačiau, jei naudojamos didesnės bandymo koncentracijos vertės, medžiaga neturi daryti reikšmingo neigiamo poveikio vandens ir nuosėdų sistemos mikrobiniam aktyvumui. Siekiant gauti pastovią bandomosios medžiagos koncentraciją skirtingų matmenų induose, gali būti naudinga reguliuoti įdedamos medžiagos kiekį pagal vandens sluoksnio gylį inde ir jo gylį lauko sąlygomis (laikant, kad jis yra lygus 100 cm, bet galima naudoti ir kitas gylio vertes). Apskaičiavimo pavyzdys pateiktas 4 priedėlyje.

Būtų geriausia bandomąją medžiagą pilti į bandymo sistemos vandeninę fazę kaip vandeninį tirpalą. Jei kitaip neįmanoma, bandomajai medžiagai įpilti ir paskirstyti leidžiama naudoti nedidelius kiekius su vandeniu 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, visiškam vienalytiškumui užtikrinti gali būti naudinga naudoti generavimo kolonėles ir išankstinį maišymą. Po vandeninio tirpalo įpylimo į bandymo sistemą vandeninę fazę rekomenduojama nestipriai maišyti, stengiantis kiek įmanoma mažiau liesti nuosėdas.

Preparatų paprastai nerekomenduojama naudoti, nes preparato ingredientai gali veikti bandomosios medžiagos ir (arba) transformavimo produktų pasiskirstymą tarp vandens ir nuosėdų fazių. Tačiau jei bandomoji medžiaga yra mažai tirpi vandenyje, preparatas gali būti tinkamas pasirinkimas.

Inkubavimo indų skaičius priklauso nuo mėginių ėmimo kartų skaičiaus (žr. 1.9.3 skirsnį). Turi būti naudojamas pakankamas bandymo sistemų skaičius, kad kiekvieną kartą imant mėginį būtų galima paaukoti dvi sistemas. Jei naudojami kiekvienos vandens ir nuosėdų sistemos kontroliniai ėminiai, jie neturi būti apdorojami bandomąja medžiaga. Kontroliniai įrenginiai gali būti naudojami nuosėdų mikrobinei biomasei ir vandens bei nuosėdų bendrajai organinei angliai nustatyti tyrimo pabaigoje. Du iš kontrolinių įrenginių (t. y. po vieną kontrolinį įrenginį

<sup>(1)</sup> Naujausi tyrimai parodė, kad, jei laikoma esant 4 °C, gali sumažėti nuosėdų organinės anglies kiekis, dėl ko gali sumažėti mikrobinis aktyvumas.

<sup>(2)</sup> Toms cheminėms medžiagoms, kurios į paviršinius vandenis patenka skirtingais būdais, kai dėl to gaunamos labai skirtingos koncentracijos vertės, gali būti naudingas bandymas naudojant antrą koncentraciją, jei mažesniąją koncentraciją galima nustatyti pakankamai tiksliai.

kiekvienoms vandeninėms nuosėdoms) gali būti naudojami reikiamiems nuosėdų ir vandens parametrams kontroliuoti aklimatizacijos laikotarpiu (žr. 1.8.2.2 skirsnio lentelę). Du papildomi kontroliniai įrenginiai turi būti įtraukti tuo atveju, kai bandomoji medžiaga įpilama naudojant tirpiklį, kad būtų galima matuoti jo neigiamą poveikį bandymo sistemos mikrobiniam aktyvumui.

### 1.9.3. **Bandymo trukmė ir mėginių ėmimas**

Tyrimas paprastai neturi būti ilgesnis kaip 100 parų (6), ir turi vykti tol, kol nustatomas skilimo kelias ir pasiskirstymo tarp vandens ir nuosėdų charakteristika arba 90 % bandomosios medžiagos išsisklaido transformavimo keliu ir (arba) išgaruoja. Mėginiai turi būti imami bent šešis kartus (įskaitant nulinį laiką), naudojant neprivalomą pradinį tyrimą (žr. 1.9.4 skirsnį) tinkamam mėginių ėmimo režimui ir bandymo trukmei nustatyti, išskyrus kai apie bandomąją medžiagą yra pakankamas kiekis duomenų iš ankstesnių tyrimų. Jei tiriamos hidrofobinės bandomosios medžiagos, pradinio tyrimo laikotarpiu gali būti reikalingi papildomi mėginių ėmimo taškai pasiskirstymo tarp vandens ir nuosėdų fazių greičiui nustatyti.

Atitinkamu mėginio ėmimo laiku inkubavimo indai su visu turiniu (kartotiniai mėginiai) imami analizei atlikti. Nuosėdos ir virš jų esantis vanduo analizuojami atskirai <sup>(1)</sup>. Paviršinis vanduo atsargiai nupilamas, kiek įmanoma mažiau liečiant nuosėdas. Bandomosios medžiagos ir transformavimo produktų ekstrahavimas ir apibūdinimas turi būti daromas taikant atitinkamas analizės metodikas. Reikia imtis priemonių pašalinti medžiagą, kuri galėjo adsorbuotis ant inkubavimo indo arba jungiamuosiuose vamzdeliuose, naudojamuose lakiosioms medžiagoms sugauti.

### 1.9.4. **Neprivalomas pradinis bandymas**

Jei trukmė ir mėginių ėmimo režimas negali būti įvertinti pagal ankstesnius atitinkamus bandomosios medžiagos tyrimus, gali būti tikslinga atlikti išankstinį bandymą, kuris turi būti atliekamas tomis pačiomis bandymo sąlygomis, kurios yra numatytos galutiniam tyrimui. Ataskaitoje turi būti trumpai nurodytos išankstinio bandymo, jei atliekamas, sąlygos ir rezultatai.

### 1.9.5. **Matavimai ir analizė**

Kiekvieną kartą imant mėginį matuojama ir ataskaitoje nurodoma bandomosios medžiagos ir transformavimo produktų koncentracija vandenyje ir nuosėdose (kaip koncentracija ir įdėto kiekio procentinė dalis). Paprastai galioja taisyklė, kad transformavimo produktai, kurių randama  $\geq 10\%$  nuo bendro vandens ir nuosėdų sistemos pradinio radioaktyvumo, turi būti identifikuoti, išskyrus kai galima pagrįsti, kad tai neįmanoma. Be to, turi būti identifikuoti transformavimo produktai, kurių koncentracija visą tyrimo laiką didėja, netgi jei jų koncentracija nėra didesnė už pirmiau pateiktas ribines vertes, kadangi toks reiškinys gali rodyti jų išsilaikymą. Tai turi būti nagrinėjama kiekvienu konkrečiu atveju, ataskaitoje pateikiant pagrįstus paaiškinimus.

Ataskaitoje turi būti pateikti rezultatai, kiekvienu mėginio ėmimo metu gauti dujų ar lakiųjų medžiagų sugavimo sistemose (CO<sub>2</sub> ir kiti produktai, t. y. lakieji organiniai junginiai). Turi būti pateiktos mineralizacijos greičio vertės. Kiekvienam mėginio ėmimo laikui pateikiamas neekstrahuojamų (surištųjų) likučių kiekis.

## 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<sub>50</sub> ir, jei tinka, DT<sub>75</sub> ir DT<sub>90</sub> kartu nurodant pasiklovimo ribas (žr. 1.7.3 skirsnį). Informacijos apie bandomosios medžiagos išsisklaidymo vandenyje ir nuosėdose greitį galima gauti naudojant atitinkamus įvertinimo būdus. Tai gali būti pseudopirmojo laipsnio kinetikos taikymas, empirinės geriausio kreivių atitikimo metodikos, kuriose taikomi grafines 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 imitacinių modelių ir apskaičiuojant numatomas aplinkos koncentracijos vertes. Taikant empirinius metodus arba tiesines transformacijas, galima gauti geresnį kreivių ir duomenų atitikimą, taigi geriau įvertinti pusėjimo trukmę,

<sup>(1)</sup> Tais atvejais, kai gali vykti greitas anaerobinio virsmo produktų pakartotinis oksidavimas, imant mėginius ir analizuojant turi būti užtikrinamos anaerobinės sąlygos.

DT<sub>50</sub> ir, jei tinka, DT<sub>75</sub> ir DT<sub>90</sub> vertes. Tačiau gautųjų konstantų taikymas yra ribotas. Taikant modelius su skyriais galima gauti kelias rizikos įvertinimui naudingas konstantas, kurios aprašo skilimo skirtinguose skyriuose greitį ir cheminės medžiagos pasiskirstymą. Be to, tokie modeliai turėtų būti naudojami pagrindinių transformavimo produktų susidarymo ir skilimo greičio konstantoms įvertinti. Visais atvejais pasirinktas metodas turi būti pagrįstas ir tyrėjas turi grafiškai ir (arba) statistiškai parodyti gerą atitikimo kokybę.

### 3. ATASKAITA

#### 3.1. BANDYMO ATASKAITA

Bandymo ataskaitoje turi būti ši informacija:

Bandomoji medžiaga:

- bendrinis pavadinimas, cheminis pavadinimas, CAS numeris, struktūrinė formulė (rodanti žymėtojo (-ų) atomo (-ų) padėtį, jei naudojama žymėtoji medžiaga) ir atitinkamos fizikinės ir cheminės savybės,
- bandomosios medžiagos grynumas (priemaišos),
- radiocheminis žymėtosios cheminės medžiagos grynumas ir molinis aktyvumas (jei tinka).

Etaloninės medžiagos:

- etaloninių medžiagų, naudojamų transformavimo produktams apibūdinti ir (arba) identifikuoti, cheminis pavadinimas ir struktūra.

Bandomosios nuosėdos ir vanduo:

- vandens telkinių dugno nuosėdų ėmimo vieta (-os), įskaitant, jei įmanoma, užteršimo istoriją,
- visa informacija apie vandens ir nuosėdų sistemų ėminių ėmimą, laikymą (jei taikomas) ir aklimatizavimą,
- vandens ir nuosėdų ėminių charakteristikos, išvardytos 1.8.2.2 skirsnio lentelėje.

Bandymo sąlygos:

- naudota bandymo sistema (pvz., taikanti pratekėjimą, 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 aptikimo ribos,
- transformavimo produktų apibūdinimo ar identifikavimo metodai,
- nukrypimai tyrimo metu nuo bandymo protokolo arba bandymo sąlygų.

## Rezultatai:

- tipinių analizių neapdorotų duomenų skaičiai (visi neapdoroti duomenys turi būti saugomi GLP archyve),
- taikytų analizės metodų pakartojamumas ir jautrumas,
- regeneravimo laipsnio vertės (tinkamu patvirtinto tyrimo % vertės yra pateiktos 1.7.1 skirsnyje),
- bandomosios medžiagos ir, jei tinka, transformavimo produktų ir neekstrahuojamo radioaktyvumo rezultatų, išreikšiamų kaip naudotos dozės % ir  $\text{mg kg}^{-1}$ , gautų vandenyje, nuosėdose ir visoje sistemoje (tik %), lentelės,
- masių balansas tyrimų eigoje ir juos užbaigus,
- transformavimo vandens bei nuosėdų dalyse ir visoje sistemoje (įskaitant mineralizaciją) grafinis vaizdas,
- mineralizacijos greičio vertės,
- bandomosios medžiagos ir, jei tinka, pagrindinių transformavimo produktų transformavimo vandenyje, nuosėdose ir visoje sistemoje pusėjimo arba  $DT_{50}$ , ir, jei tinka  $DT_{75}$  ir  $DT_{90}$  vertės, įskaitant pasikliovimo ribas,
- bandomosios medžiagos ir, jei tinka, pagrindinių transformavimo produktų transformavimo kinetikos įvertinimas,
- pasiūlytas transformavimo kelias, jei tinka,
- rezultatų aptarimas.

**4. NUORODOS**

- 1) BBA-Guidelines for the examination of plant protectors in the registration process. (1990). Part IV, Section 5-1: Degradability and fate of plant protectors in the water/sediment system. Germany.
- 2) Commission for registration of pesticides: Application for registration of a pesticide. (1991). Part G. Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air, Section G.2.1 (a). The Netherlands.
- 3) MAFF Pesticides SAFETY Directorate. (1992). Preliminary guideline for the conduct of biodegradability tests on pesticides in natural sediment/water systems. Ref No SC 9046. United-Kingdom.
- 4) Agriculture Canada: Environmental chemistry and fate. (1987). Guidelines for registration of pesticides in Canada. Aquatic (Laboratory) – Anaerobic and aerobic. Canada, pp 35-37.
- 5) US-EPA: Pesticide assessment guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental fate (1982). Section 162-3, Anaerobic aquatic metabolism.
- 6) SETAC-Europe publication. (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides. Ed. Dr Mark R. Lynch. SETAC-Europe, Brussels.
- 7) OECD Test Guidelines Programme. (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/sediments, Belgirate, Italy, 18-20 January 1995.
- 8) ISO/DIS 5667-12. (1994). Water quality – Sampling – Part 12: Guidance on sampling of bottom sediments.

- 9) US-EPA (1998a). Sediment/water microcosm biodegradation test. Harmonised Test Guidelines (OPPTS 835.3180). EPA 712-C-98-080.
- 10) DFG: Pesticide Bound Residues in Soil. Wiley-VCH (1998).
- 11) T.R. Roberts: Non-extractable pesticide residues in soils and plants. Pure Appl. Chem. 56, 945–956 (IUPAC 1984).
- 12) OECD Test Guideline 304A: Inherent Biodegradability in Soil (adopted 12 May 1981).
- 13) OECD (1993): Guidelines for Testing of Chemicals. Paris. OECD (1994–2000): Addenda 6–11 to Guidelines for the Testing of Chemicals.
- 14) Scholz, K., Fritz R., Anderson C. and Spittler M. (1988) Degradation of pesticides in an aquatic model ecosystem. BCPC – Pests and Diseases, 3B-4, 149–158.
- 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 <sup>14</sup>C-labelled model surfactants. Water Research 21, 661–667.
- 18) Black, C.A. (1965). Methods of Soil Analysis. Agronomy Monograph No. 9. American Society of Agronomy, Madison.
- 19) APHA (1989). Standard Methods for Examination of Water and Wastewater (17th edition). American Public Health Association, American Water Works Association and Water Pollution Control Federation, Washington D.C.
- 20) Rowell, D.L. (1994). Soil Science Methods and Applications. Longman.
- 21) Light, T.S. (1972). Standard solution for redox potential measurements. Anal. Chemistry 44, 1038–1039.
- 22) SETAC-Europe publication (1991). Guidance document on testing procedures for pesticides in freshwater mesocosms. From the Workshop „A Meeting of Experts on Guidelines for Static Field Mesocosms Tests“, 3–4 July 1991.
- 23) SETAC-Europe publication. (1993). Guidance document on sediment toxicity tests and bioassays for freshwater and marine environments. From the Workshop On Sediment Toxicity Assessment (WOSTA), 8–10 November 1993. Eds.: I.R. Hill, P. Matthiessen and F. Heimbach.
- 24) Vink, J.P.M., van der Zee, S.E.A.T.M. (1997). Pesticide biotransformation in surface waters: multivariate analyses of environmental factors at field sites. Water Research 31, 2858–2868.
- 25) Vink, J.P.M., Schraa, G., van der Zee, S.E.A.T.M. (1999). Nutrient effects on microbial transformation of pesticides in nitrifying waters. Environ. Toxicol, 329–338.
- 26) Anderson, T.H., Domsch, K.H. (1985). Maintenance carbon requirements of actively-metabolising microbial populations under *in-situ* conditions. Soil Biol. Biochem. 17, 197–203.
- 27) ISO-14240–2. (1997). Soil quality – Determination of soil microbial biomass – Part 2: Fumigation-extraction method.
- 28) Beelen, P. Van and F. Van Keulen. (1990), The Kinetics of the Degradation of Chloroform and Benzene in Anaerobic Sediment from the River Rhine. Hydrobiol. Bull. 24 (1), 13–21.

- 29) Shelton, D.R. and Tiedje, J.M. (1984). General method for determining anaerobic biodegradation potential. *App. Environ. Microbiol.* 47, 850–857.
- 30) Birch, R.R., Biver, C., Campagna, R., Gledhill, W.E., Pagga, U., Steber, J., Reust, H. and Bontinck, W.J. (1989). Screening of chemicals for anaerobic biodegradation. *Chemosphere* 19, 1527–1550.
- 31) Pagga, U. and Beimborn, D.B. (1993). Anaerobic biodegradation tests for organic compounds. *Chemosphere* 27, 1499–1509.
- 32) Nuck, B.A. and Federle, T.W. (1986). A batch test for assessing the mineralisation of  $^{14}\text{C}$ -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 priedėlis***NURODYMAI DĖL AEROBINIŲ IR ANAEROBINIŲ BANDYMO SISTEMŲ****Aerobinė bandymų sistema**

Šiame bandymo metode aprašytą aerobinę bandymo sistemą sudaro aerobinis vandens sluoksnis (tipinė deguonies koncentracijos verčių intervalas nuo 7 iki 10 mg l<sup>-1</sup>) ir nuosėdų sluoksnis, aerobinis paviršiuje ir anaerobinis giliau po paviršiniu sluoksniu (tipinės vidutinės oksidacijos-redukcijos potencialo ( $E_h$ ) vertės anaerobinėje nuosėdų zonoje yra nuo -80 iki -190 mV). Drėgnas oras leidžiamas virš vandens paviršiaus kiekviename inkubavimo įrenginyje pakankamam deguonies kiekiui erdvėje virš skysčio užtikrinti.

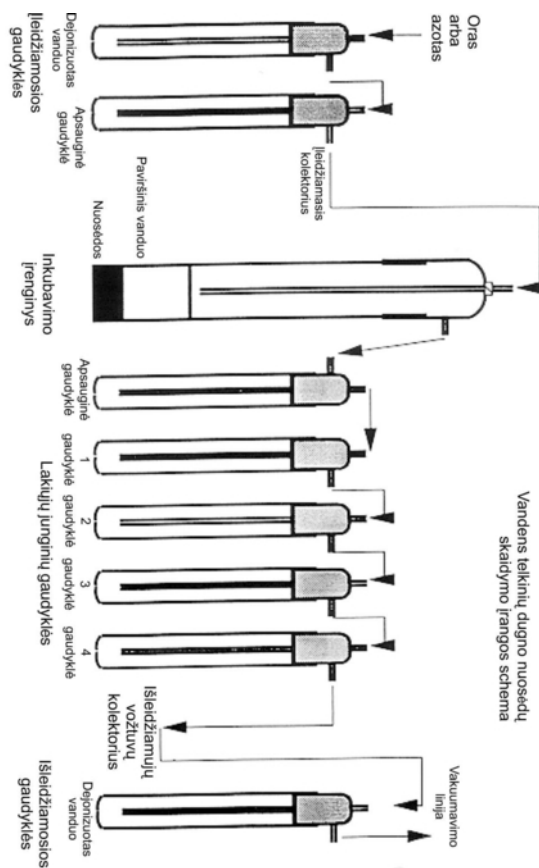
**Anaerobinė bandymų sistema**

Bandymo naudojant anaerobinę bandymo sistemą metodika iš esmės atitinka metodiką, aprašytą aerobinei sistemai, išskyrus tai, kad virš vandens paviršiaus leidžiamas drėgnas azotas kiekviename inkubavimo įrenginyje pakankamam azoto kiekiui erdvėje virš skysčio užtikrinti. Nuosėdos ir vanduo laikomi anaerobiniais, kai oksidacijos-redukcijos potencialas ( $E_h$ ) yra mažesnis kaip -100 mV.

Atliekant anaerobinį bandymą, mineralizacijos įvertinimą sudaro ir išsiskyrusio anglies dioksido bei metano kiekio matavimas.

## 2 priedėlis

## DUJŲ PRATEKĖJIMO APARATŪROS PAVYZDYS

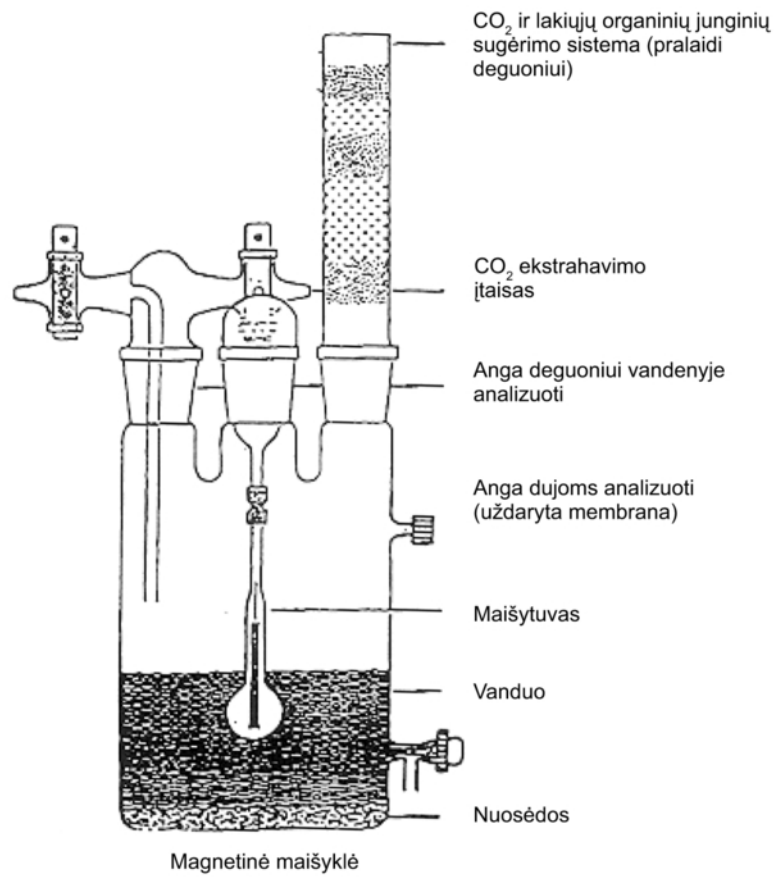


Apsauginė gaudyklė, tuščia  
 1 gaudyklė – etilenglikolis lakiesiems organiniams junginiams gaudyti  
 2 gaudyklė – 0,1 mol/l sieros rūgšties lakiesiems šarminiams junginiams gaudyti



## 3 priedėlis

## BIOMETRINĖS APARATŪROS PAVYZDYS



## 4 priedėlis

**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 <sup>2</sup>
Įterpimo norma: 500 g bandomosios medžiagos/ha atitinka 5 μg/cm <sup>2</sup>	
Bendras 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 50 μg/l

---



## 2011 m. prenumeratos kainos (be PVM, įskaitant paprastosios siuntos išlaidas)

<i>ES oficialusis leidinys</i> , L ir C serijos, tik spausdintinė versija	22 oficialiosiomis ES kalbomis	1 100 EUR per metus
<i>ES oficialusis leidinys</i> , L ir C serijos, spausdintinė versija ir metinis skaitmeninis diskas	22 oficialiosiomis ES kalbomis	1 200 EUR per metus
<i>ES oficialusis leidinys</i> , L serija, tik spausdintinė versija	22 oficialiosiomis ES kalbomis	770 EUR per metus
<i>ES oficialusis leidinys</i> , L ir C serijos, mėnesinis kaupiamasis skaitmeninis diskas	22 oficialiosiomis ES kalbomis	400 EUR per metus
Oficialiojo leidinio priedas, S serija (Konkursai ir viešieji pirkimai), skaitmeninis diskas, leidžiamas vieną kartą per savaitę	daugiakalbis: 23 oficialiosiomis ES kalbomis	300 EUR per metus
<i>ES oficialusis leidinys</i> , C serija. Konkursai	konkursų kalbomis	50 EUR per metus

*Europos Sąjungos oficialųjį leidinį*, leidžiamą oficialiosiomis Europos Sąjungos kalbomis, galima prenumeruoti bet kuria iš 22 kalbų. Jį sudaro L (teisės aktai) ir C (informacija ir pranešimai) serijos.

Kiekviena kalba leidžiamas leidinys prenumeruojamas atskirai.

Oficialieji leidiniai airių kalba parduodami atskirai, remiantis 2005 m. birželio 18 d. Oficialiajame leidinyje L 156 paskelbtu Tarybos reglamentu (EB) Nr. 920/2005, nurodančiu, kad Europos Sąjungos institucijos laikinai neįpareigojamos rengti ir skelbti visų aktų airių kalba.

Oficialiojo leidinio priedas (S serija. Konkursai ir viešieji pirkimai) skelbiamas viename daugiakalbiame skaitmeniniame diske visomis 23 oficialiosiomis kalbomis.

Pateikę paprastą prašymą *Europos Sąjungos oficialiojo leidinio* prenumeratoriai gali gauti įvairius Oficialiojo leidinio priedus. Apie priedų išleidimą prenumeratoriai informuojami pranešime skaitytojui, kuris skelbiamas *Europos Sąjungos oficialiajame leidinyje*.

## Pardavimas ir prenumerata

Įvairių mokamų leidinių, tokių kaip *Europos Sąjungos oficialusis leidinys*, galima užsiprenumeruoti mūsų pardavimo biuruose. Pardavimo biurų sąrašą galima rasti internete adresu

[http://publications.europa.eu/others/agents/index\\_lt.htm](http://publications.europa.eu/others/agents/index_lt.htm)

**EUR-Lex (<http://eur-lex.europa.eu>) – tai tiesioginė ir nemokama prieiga prie Europos Sąjungos teisės aktų. Šiame tinklalapyje galima skaityti *Europos Sąjungos oficialųjį leidinį*, susipažinti su sutartimis, teisės aktais, precedentine teise bei parengiamaisiais teisės aktais.**

**Išsamesnės informacijos apie Europos Sąjungą rasite <http://europa.eu>**

