На основу члана 15. став 3. Закона о хемикалијама („Службени гласник РС”, бр. 36/09, 88/10, 92/11 и 93/12),

Министар енергетике, развоја и заштите животне средине доноси

ПРАВИЛНИК
о методама испитивања опасних својстава хемикалија
"Службени гласник РС", број 117 од 30. децембра 2013.

Члан 1.

Овим правилником прописују се методе испитивања опасних својстава хемикалија.

Члан 2.

Методе испитивања физичких и хемијских својстава хемикалија дате су у Прилогу 1.

Методе испитивања својстава хемикалија која утичу на живот и здравље људи дате су у Прилогу 2.

Методе испитивања својстава хемикалија која утичу на животну средину дате су у Прилогу 3.

Прилози 1, 2. и 3. чине саставни део овог правилника.

Члан 3.

Даном ступања на снагу овог правилника престаје да важи Правилник о методама испитивања опасних својстава хемикалија („Службени гласник РС”, број 42/11).

Члан 4.

Овај правилник ступа на снагу осмог дана од дана објављивања у „Службеном гласнику Републике Србије”.

Број 110-00-86/2013-09
У Београду, 18. децембра 2013. године
Министар,
проф. др **Зорана Михајловић,** с.р.

Прилог 1.

А.1. ТЕМПЕРАТУРА ТОПЉЕЊА / МРЖЊЕЊА

Део први

1. МЕТОДА ИСПИТИВАЊА

Већина описаних метода заснива се на Упутству за испитивање OECD[1]. Основни принципи методе дати су у литератури[2, 3].

1.1. УВОД

Описане методе и уређаји примењују се за одређивање температуре топљења супстанци, без ограничења у погледу степена чистоће.

Избор методе зависи од природе супстанце која се испитује. Последица тога је да је ограничавајући фактор да ли се супстанца спрашује лако, тешко или се не може спрашити.

За неке супстанце више одговара одређивање температуре мржњења или температуре очвршћавања, а стандарди за ова одређивања дати су у овој методи.

Када се због одређених својстава супстанце не може измерити ниједан од наведених параметара, одговарајућом се сматра температура течења.

1.2. ДЕФИНИЦИЈЕ И МЕРНЕ ЈЕДИНИЦЕ

Температура топљења јесте температура на којој се одвија фазни прелаз из чврстог у течно стање на атмосферском притиску, а та температура идеално одговара температури мржњења.

Фазни прелаз многих супстанци дешава се у температурном опсегу, па се он често описује као опсег топљења.

Превођење јединица (К у° С):

t = T - 273,15

при чему:

t јесте температура у степенима Целзијуса (°C);

T јесте термодинамичка температура у степенима келвина (K).

1.3. РЕФЕРЕНТНЕ СУПСТАНЦЕ

Референтне супстанце се не користе сваки пут када се испитује нова супстанца. Оне првенствено служе за повремену проверу методе и да омогуће поређење са резултатима добијеним другим методама.

Неке супстанце које се користе за калибрацију дате су у литератури[4].

1.4. ПРИНЦИП МЕТОДЕ

Одређује се температура (температурни опсег) фазног прелаза из чврстог у течно стање или из течног у чврсто стање. У пракси се одређују температуре почетне и финалне фазе топљења/мржњења, загревањем/хлађењем узорка супстанце која се испитује на атмосферском притиску. Дато је пет типова метода: метода одређивања температуре топљења у капилари, метода грејне плоче са постепеним загревањем, метода одређивања температуре мржњења, метода термалне анализе и метода одређивања температуре течења (развијена за нафтна уља).

У одређеним случајевима, уместо мерења температуре топљења, погодно је мерење температуре мржњења.

1.4.1. Метода одређивања температуре топљења у капилари

1.4.1.1. Уређаји за одређивање температуре топљења у купатилу са течношћу

Мала количина фино спрашене супстанце ставља се у капилару и сабије се. Капилара се загрева, заједно са термометром, а пораст температуре се подешава на мање од око 1 K/min за време топљења. Одређују се почетна и завршна температура топљења.

1.4.1.2. Температура топљења у уређајима са металним блоком

Поступак је исти као поступак описан у одељку 1.4.1.1. ове методе, осим што се капиларна цев и термометар стављају у метални блок који се загрева и могу да се посматрају кроз отворе у блоку.

1.4.1.3. Фотоћелијска детекција

Узорак се налази у капилари и загрева се аутоматски у металном цилиндру. Зрак светлости се усмерава кроз супстанцу кроз отвор на цилиндру, на прецизно калибрисану фотоћелију. Оптичка својства већине супстанци се приликом топљења мењају од непровидности до провидности. Интензитет светлости која долази до фотоћелије расте и шаље сигнал за заустављање на дигитални индикатор где се очитава температура са резистентног (отпорног) термометра од платине који је смештен у комори за загревање. Ова метода није погодна за неке јако обојене супстанце.

1.4.2. Метода грејне плоче са постепеним загревањем

1.4.2.1. Одређивање температуре топљења по Кофлеру

У овом поступку користе се две металне шипке различите термичке проводљивости, које се загревају помоћу електричне струје. Полуга је изведена на начин да је температурни градијент углавном линеаран на целој њеној дужини. Температура вреле полуге је између 283 K и 573 K са специјалним уређајем за очитавање температуре, који укључује и клизач са показивачем и индикатором направљеним специјално за ту полугу. Да би се одредила температура топљења, супстанца се у танком слоју наноси директно на површину вреле полуге. У року од неколико секунди појављује се оштра линија раздвајања између течности и чврсте фазе. Температура на линији раздвајања очитава се на начин да се показивач подеси на линију у мирном положају.

1.4.2.2. Микроскоп за одређивање температуре топљења

У употреби се налази неколико типова микроскопа са грејним плочама са постепеним загревањем. Користе се нарочито када се одређују температуре топљења малих количина супстанци. Код већине грејних плоча температура се мери осетљивим термоелементом, а понекад се користе и термометри са живом. Типичан уређај за одређивање температуре топљења на грејној плочи са постепеним загревањем са микроскопом има комору за загревање унутар које се налази метална плоча на коју се наноси узорак на покривној (клизној) стакленој плочици. У центру металне плоче налази се отвор кроз који пролази светлост са осветљеног огледала микроскопа. Када се користи, комора је затворена стакленом плочом која спречава продор ваздуха до узорка.

Загревање узорка се регулише реостатом. За веома прецизна мерења оптички анизотропних супстанци користи се поларизовано светло.

1.4.2.3. Мениск метода

Ова метода се нарочито користи за полиамиде.

Температура на којој се истискује мениск силиконског уља, које је затворено између грејне плоче и стакленог поклопца и уз помоћ узорка полиамида који се испитује, одређује се визуелно.

1.4.3. Метода одређивања температуре мржњења

Узорак се ставља у посебну цев (епрувету) за испитивање и смешта се у апарат за одређивање температуре мржњења. Узорак се полако и непрестано меша за време хлађења, а температура се мери у одговарајућим интервалима. Када температура постане константна у неколико очитавања, та температура (коригована за вредност грешке термометра) бележи се као температура мржњења.

Прехлађивање се избегава одржавањем равнотеже између чврсте и течне фазе.

1.4.4. Метода термалне анализе

1.4.4.1 Диференцијална термална анализа (ДТА)

Овом методом бележе се разлике у температурама супстанце и референтног материјала, у функцији од температуре, када се супстанца и референтни материјал подвргавају истом контролисаном температурном програму. Када узорак пролази фазни прелаз, долази до промене енталпије, а та промена се очитава путем ендотермног (за топљење) или егзотермног (за мржњење) одступања забележене температуре од базне линије.

1.4.4.2. Диференцијална скенирајућа калориметрија (ДСЦ)

Овом методом бележи се разлика у унетој енергији (топлоти) супстанце и референтног материјала, у функцији од температуре, када се супстанца и референтни материјал подвргавају истом контролисаном температурном програму. Ова енергија јесте енергија неопходна за успостављање нулте температурне разлике између супстанце и референтног материјала. Када узорак пролази фазни прелаз, долази до промене енталпије, а та промена се очитава путем ендотермног (за топљење) или егзотермног (за мржњење) одступања забележеног протока топлоте од базне линије.

1.4.5. Метода одређивања температуре течења

Ова метода је развијена за нафтна уља и погодна је за коришћење код уљастих супстанци које имају ниске температуре топљења.

После припремног загревања, узорак се хлади по специфичном режиму и у интервалима од 3 K испитују се карактеристике протока. Најнижа температура при којој се уочава кретање супстанце бележи се као температура течења.

1.5. КРИТЕРИЈУМИ КВАЛИТЕТА

Примењивост и прецизност различитих метода које се користе за одређивање температуре топљења/опсега топљења наведене су у табелама.

Табела 1: Метода одређивања температуре топљења у капилари

Метода мерења	Супстанце које се могу фино прашити	Супстанце које нису фино спрашене	Температурни опсег	Процењена прецизност(1)
Уређаји са купатилом са течношћу[I]	да	мали број	273 K до 573 K	± 0,3 K
Уређаји са металним блоком[II]	да	мали број	293 K до > 573 K	± 0,5 K
Фотоћелијска детекција	да	већи број уз уређај за примену	253 K до 573 K	± 0,5 K

(1) Зависи од врсте инструмента и од степена чистоће супстанце.

Табела 2. Метода грејне плоче са постепеним загревањем и метода одређивања температуре мржњења

Метода мерења	Супстанце које се могу фино спрашити	Супстанце које нису фино спрашене	Температурни опсег	Процењена прецизност(1)
Кофлерова[III] метода	да	не	283 K до >573 K	± 1 K
Микроскопске[IV] методе	да	мали број	293 K до > 573 K	± 0,5 K
Мениск метода[V]	не	специфична за	293 K до >573 K	± 0,5 K

		полиамиде		
Температура мржњења[VI]	да	да	223 K до 573 K	± 0,5 K

(1) Зависи од врсте инструмента и од степена чистоће супстанце.

Табела 3: Метода термалне анализе

Метода мерења	Супстанце које се могу фино спрашити	Супстанце које нису фино спрашене	Температурни опсег	Процењена прецизност(1)
Диференцијална термална анализа[VII]	да	да	173 K до 1273 K	до 600 K ± 0,5 K од 600 K до 1273 K ± 2,0 K
Диференцијална скенирајућа калориметрија[VII]	да	да	173 K до 1273 K	до 600 K ± 0,5 K од 600 K до 1273 K ± 2,0 K

(1) Зависи од врсте инструмента и од степена чистоће супстанце.

Табела 4: Метода одређивања температуре течења

Метода мерења	Супстанце које се могу фино спрашити	Супстанце које нису фино спрашене	Температурни опсег	Процењена прецизност(1)
Температура течења[8]	за нафтне производе и уљасте супстанце	за нафтне производе и уљасте супстанце	223 K до 323 K	± 0,3 K

(1) Зависи од врсте инструмента и од степена чистоће супстанце.

I JIS K 0064

II ISO 1218 (E)

III ANSI/ASTM D 3451-76

IV DIN 5 3736

V ISO 1218 (E)

VI BS 4695

VII ASTM E 537-76

VIII ASTM D 97-66

1.6. ОПИС МЕТОДЕ

Поступци скоро свих метода испитивања описани су у међународним и националним стандардима (видети Део други ове методе).

1.6.1. Метода одређивања температуре топљења у капилари

Спрашене супстанце када се изложе споријем расту температуре обично пролазе кроз фазе топљења приказане на Слици 1.

Слика 1.

При чему:

Фаза А (почетак топљења) јесте фаза у којој ситне капљице једнолично приањају на унутрашњи зид капиларне цеви;

Фаза Б јесте фаза у којој се јавља простор између узорка и унутрашњег зида услед сакупљања истопљене материје;

Фаза Ц јесте фаза у којој сакупљени узорак почиње да пада наниже и да прелази у течно стање;

Фаза Д јесте фаза у којој се на површини формира мениск, иако извесна количина узорка и даље остаје у чврстом стању;

Фаза Е јесте завршна фаза топљења у којој нема чврстих честица.

Током одређивања температуре топљења, температуре се бележе на почетку топљења (фаза А) и у завршној фази (фаза Е).

1.6.1.1. Уређаји за одређивање температуре топљења у купатилу са течношћу

На Слици 2. приказан је стандардни апарат од стакла за одређивање температуре топљења[IX]. Све димензије дате су у милиметрима.

Слика 2.

При чему:

А јесте суд за мерење;

В јесте запушач;

С јесте одушка;

D јесте термометар[X];

Е јесте помоћни термометар;

F јесте купатило са течношћу;

G јесте стаклена капилара дужине 80 mm до 100 mm, унутрашњег пречника 1,0 mm ± 0,2 mm, дебљине зида 0,2 mm до 0,3 mm;

Н јесте бочна цев.

Купатило са течношћу

Потребно је изабрати одговарајућу течност. Избор течности зависи од температуре топљења која се одређује, нпр. течни парафин за температуре топљења испод 473 K, силиконско уље за температуре топљења испод 573 K.

За температуре топљења изнад 523 K користи се смеша која се састоји од три дела сумпорне киселине и два дела калијум-сулфата (масени односи). При коришћењу овакве смеше потребно је предузети све мере предострожности.

Поступак

Сува супстанца се фино спраши у посуди и убацује се у капилару, затворену на једном крају, тако да ниво пуњења буде око 3 mm након што се чврсто напакује. Да се добије хомогено спаковани узорак, капиларна цев се испушта вертикално кроз стаклену цев, са висине од око 700 mm, на сахатно стакло.

Напуњена капилара се ставља у купатило тако да средњи део резервоара са живом термометра додирује капилару у делу у ком је смештен узорак. Обично се капилара ставља у апарат на око 10 K испод температуре топљења.

Купатило са течношћу се загрева тако да температура расте приближно 3 K/min. Течност се меша. На око 10 K испод

очекиване температуре топљења брзина раста температуре се подешава на максимално 1 K/min.

Израчунавање

Израчунавање температуре топљења врши се на следећи начин:

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

при чему:

T јесте коригована температура топљења у K;

T_D јесте температура очитана на термометру D у K;

T_E јесте температура очитана на термометру E у K;

n јесте број подеока живиног стуба на термометру D са Слике 2. чије је стабло урођено у купатило.

1.6.1.2 Уређаји за одређивање температуре топљења са металним блоком

Апаратура

Апаратура се састоји од:

– цилиндричног металног блока, чији је горњи део шупаљ и формира комору (видети Слику 3);

– металног поклопца, са два или више отвора кроз које се могу убацити цеви у метални блок;

– грејног система металног блока снабдевеним нпр. електричним отпорником смештеним у блоку;

– реостата (отпорника) за регулацију струје, уколико се користи грејање на струју;

– четири прозора од стакла отпорног на топлоту на бочним зидовима коморе, који су међусобно постављени под правим углом. Испред једног од прозора постављен је окулар за посматрање капиларне цеви. Остала три прозора су постављена ради осветљавања унутрашњости помоћу лампи;

– капиларне цеви од стакла отпорног на топлоту, затворене на једном крају (видети одељак 1.6.1.1. ове методе).

Термометар

Видети стандарде наведене у одељку 1.6.1.1. ове методе. Могу се применити и термо-електрични мерни уређаји са упоредивом (сличном) тачношћу.

Слика 3.

1.6.1.3. Фотоћелијска детекција

Апаратура и процедура

Апаратура се састоји од металне коморе са аутоматским системом грејања. Три капиларе се припремају у складу са одељком 1.6.1.1. ове методе и стављају се у пећ.

За калибрацију апарата на располагању је неколико линеарних повећања температуре (температурних програма). Одговарајући пораст температуре се електрично подешава на основу претходно изабране константне и линеарне брзине. Показивачи бележе и показују тренутну температуру у пећи и температуру супстанце у капиларама.

1.6.2. Метода грејне плоче са постепеним загревањем

1.6.2.1. Одређивање температуре топљења по Кофлеру

Видети Део други ове методе.

1.6.2.2. Микроскоп за одређивање температуре топљења

Видети Део други ове методе.

1.6.2.3. Мениск метода (за полиамиде)

Видети Део други ове методе.

Брзина загревања око температуре топљења треба да је мања од 1 K/min.

1.6.3. Метода одређивања температуре мржњења

Видети Део други ове методе.

1.6.4. Метода термалне анализе

1.6.4.1. Диференцијална термална анализа

Видети Део други ове методе.

1.6.4.2. Диференцијална скенирајућа калориметрија

Видети Део други ове методе.

1.6.5. Метода одређивања температуре течења

Видети Део други ове методе.

_____

IX JIS K 0064

X Могу се користити само термометри који испуњавају услове стандарда: ASTM E 1-71, DIN 12770, JIS K 8001 или услове еквивалентних стандарда.

2. ПОДАЦИ

У неким случајевима неопходно је извршити корекцију термометра.

3. ИЗВЕШТАЈ

Извештај о испитивању, уколико је могуће, садржи податке о:

– коришћеној методи;

– прецизном опису супстанце (идентитет и нечистоће) и корацима претходних пречишћавања, уколико их је било;

– процени прецизности.

Средња вредност најмање два мерења која су у опсегу процењене прецизности (видети табеле) наводи се као температура топљења.

Уколико је разлика између температуре на почетку и на крају завршне фазе топљења у границама прецизности методе, температура у завршној фази топљења се узима као температура топљења. Уколико наведена разлика није у границама прецизности методе, у извештају се наводе две температуре.

Уколико се супстанца разложи или сублимује пре постизања температуре топљења, наводи се температура на којој је уочен ефекат.

У извештају се наводе сви подаци и примедбе важне за тумачење резултата, нарочито подаци о нечистоћама и физичком стању супстанце.

4. ЛИТЕРАТУРА

1. OECD, Paris, 1981, Test Guideline 102, Decision of the Council C(81) 30 final

2. IUPAC, 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.,Interscience Publ., New York, 1959, vol. I, Део I, Одељак VII p. 803-834

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

Део други
ДОДАТНИ ТЕХНИЧКИ ПОДАЦИ

Додатни технички подаци могу се пронаћи у следећим стандардима:

1. Метода одређивања температуре топљења у капилари

1.1. Уређаји за одређивање температуре топљења у купатилу са течношћу

ASTM E 324-69	Standard test method for relative initial and final melting points and the melting range of organic chemicals
BS 4634	Method for the determination of melting point and/or melting range
DIN 53181	Bestimmung des Schmelzintervalles von Harzen nach Kapillarverfarehn
JIS K 00-64	Testing methods for melting point of chemical products

1.2. Уређаји са металним блоком

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

2. Метода грејне плоче са постепеним загревањем

2.1. Одређивање температуре топљења по Кофлеру

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

2.2. Микроскоп за одређивање температуре топљења

DIN 53736	Visuelle Bestimmung der Schmelztemperatur von teilkristallinen Kunststoffen

2.3. Мениск метода (полиамиди)

ISO 1218 (E)	Plastics – polyamides – determination of „melting point”
ANSI/ASTM D 2133-66	Standard specification for acetal resin injection moulding and extrusion materials
NF T 51-050	Résines de polyamides. Détermination du „point de fusion” méthode du ménisque

3. Метода одређивања температуре мржњења

BS 4633	Method for the determination of crystallising point
BS 4695	Method for Determination of Melting Point of petroleum wax (Cooling Curve)
DIN 51421	Bestimmung des Gefrierpunktes von Flugkraftstoffen, Ottokraftstoffen und Motorenbenzolen
ISO 2207	Cires de pétrole: détermination de la température de figeage
DIN 53175	Bestimmung des Erstarrungspunktes von Fettsäuren
NF T 60-114	Point de fusion des paraffines
NF T 20-051	Méthode de détermination du point de cristallisation (point de congélation)
ISO 1392	Method for the determination of the freezing point

4. Метода термалне анализе

4.1. Диференцијална термална анализа

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

4.2. Диференцијална скенирајућа калориметрија

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

5. Метода одређивање температуре течења

NBN 52014	Echantillonnage et analyse des produits du pétrole: Point de trouble et point d'écoulement limite – Monsterneming en ontleding van aardolieproducten:Troebelingspunt en vloeipunt
ASTM D 97-66	Standard test method for pour point of petroleum oils
ISO 3016	Petroleum oils – Determination of pour point

А.2. ТЕМПЕРАТУРА КЉУЧАЊА

Део први

1. МЕТОДА ИСПИТИВАЊА

Ова метода заснива се на Упутству за испитивање OECD[1]. Основни принципи методе дати су у литератури[2, 3].

1.1. УВОД

Описане методе и уређаји могу се примењивати на течне супстанце и супстанце са ниском температуром топљења, ако не подлежу хемијској реакцији на температурама испод температуре кључања (нпр. аутооксидација, премештања, разлагање итд). Методе се примењују на течне супстанце које су чисте, као и на оне које садрже нечистоће.

Нагласак је на методама које користе фотоћелијску детекцију и термалну анализу, јер методе омогућавају одређивање температура топљења, као и температура кључања. Мерења могу да се врше аутоматски.

Динамичка метода која је дата у овом прилогу има ту предност да примењује и за одређивање напона паре и није неопходно вршити корекцију температуре кључања на нормални притисак (101,325 kPa), јер се нормалан притисак подешава помоћу маностата за време мерења.

Напомене: Утицај нечистоћа на одређивање температуре кључања у великој мери зависи од природе нечистоће. Када су у узорку присутне испарљиве нечистоће које могу утицати на резултат, супстанца се може пречистити.

1.2. ДЕФИНИЦИЈЕ И МЕРНЕ ЈЕДИНИЦЕ

Нормална температура кључања јесте температура при којој је напон паре течности 101,325 kPa.

Уколико се температура кључања не мери при нормалном атмосферском притиску, зависност температуре од притиска паре описује се преко Клаузијус – Клапејронове једначине:

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

при чему:

p јесте притисак паре супстанце у Паскалима;

DH_v јесте топлота испарења у J mol^{-1};

R јесте универзална гасна константа која износи 8,314 J mol^{-1} K^{-1};

T јесте термодинамичка температура у степенима келвина (K);

Температура кључања се наводи уз узимање у обзир амбијенталног притиска за време мерења.

Превођење јединица:

Притисак (мерна јединица: kPa): 100 kPa = 1; bar = 0,1 MPa (Дозвољава се коришћење мерне јединице „bar", али се не препоручује).

133 Pa = 1 mm; Hg = 1 Torr (Не дозвољава се коришћење мерне јединице „mm Hg" и „Torr").

1 atm = стандардна атмосфера = 101 325 Pa (Не дозвољава се коришћење мерне јединице „atm").

Температура (мерна јединица: K): t = T – 273,15

при чему:

t јесте температура у степенима Целзијуса (°C);

T јесте термодинамичка температура у степенима келвина (K).

1.3. РЕФЕРЕНТНЕ СУПСТАНЦЕ

Референтне супстанце се не користе сваки пут када се испитује нова супстанца. Оне првенствено служе за повремену проверу методе и да омогуће поређење са резултатима добијеним другим методама.

Неке супстанце које се користе за калибрацију дате су у методама у Делу другом.

1.4. ПРИНЦИП МЕТОДЕ

Дато је седам типова метода за одређивање температуре кључања (опсега кључања). Пет метода заснива се на мерењима температура кључања, док се две методе заснивају на термалној анализи.

1.4.1. Мерење температуре кључања

1.4.1.1. Одређивање температуре кључања употребом ебулиометра

Ебулиометри су изворно развијени за одређивање молекулске тежине на основу повећања тачке кључања, али су погодни и за мерења тачне тачке кључања[XI]. Течност се загрева у овом апарату, при равнотежним условима, на атмосферском притиску све до кључања.

_____

XI Веома једноставан апарат описан је у стандарду ASTM D 1120-72

1.4.1.2. Динамичка метода

Ова метода обухвата мерење температуре при којој долази до поновне кондензације паре помоћу одговарајућег термометра у повратном току за време кључања. Код ове методе може бити варијација у притиску.

1.4.1.3. Метода дестилације за одређивање температуре кључања

Ова метода обухвата дестилацију течности и мерење температуре при којој долази до поновне кондензације паре и одређивање количине дестилата.

1.4.1.4. Метода одређивања температуре кључања по Сиволобофу

Узорак се загрева у цеви (епрувети) за узорак, која је урођена у течност купатила за грејање. Затопљена капилара, која има ваздушни мехур у доњем делу, спушта се у цев (епрувети) за узорке.

1.4.1.5. Фотоћелијска детекција

Ради на принципу методе одређивања температуре кључања по Сиволобофу, уз аутоматско фото-електрично мерење растућих мехура.

1.4.2. Термална анализа

1.4.2.1. Диференцијална термална анализа

Овом техником бележи се температурна разлика између супстанце и референтног материјала као функције температуре, док се супстанца и референтни материјал излажу истом контролисаном температурном програму. Када узорак пролази фазни прелаз, долази до промене енталпије, а та промена се очитава путем ендотермног одступања (кључање) забележене температуре од базне линије.

1.4.2.2. Диференцијална скенирајућа калориметрија

Овом техником бележи се разлика у промени енергије (топлоте) у супстанци и референтном материјалу у функцији од температуре, док се супстанца и референтни материјал излажу истом контролисаном температурном програму. Ова енергија јесте енергија неопходна за успостављање нулте температурне разлике између супстанце и референтног материјала. Када узорак прође фазни прелаз, праћен променом енталпије, таква промена се приказује ендотермним одступањем (кључање) забележеног протока топлоте од базне линије.

1.5. КРИТЕРИЈУМИ КВАЛИТЕТА

Примењивост и прецизност различитих метода које се користе за одређивање температуре кључања/опсега кључања наведени су у Табели 1.

Табела 1: Поређење метода

Метода мерења	Процењена тачност
Ебулиометар[XII]	± 1,4 K (до 373 K)[(1)(2)]

	± 2,5 K (до 600 K)[(1)(2)]
Динамичка метода	± 0,5 K (до 600 K) [(2)]
Дестилација[XIII]	± 0,5 K (до 600 K)
Метода по Сиволобофу	± 2 K (до 600 K) [(2)]
Фотоћелијска детекција	± 0,3 K (до 373 K) [(2)]
Диференцијална термална анализа[XIV]	± 0,5 K (до 600 K) ± 2,0 K (до 1273 K)
Диференцијална скенирајућа калориметрија[XV]	± 0,5 K (до 600 K) ± 2,0 K (до 1273 K)

[(1)] Ова прецизност је валидна само за једноставне уређаје као што су уређаји описани нпр. у стандарду ASTM D 1120-72. Прецизност се побољшава применом модернијих ебулиометара.

[(2)] Ова прецизност је валидна само за чисте супстанце. Употреба у другим случајевима се оправдава. Одређује се процењена тачност.

_____

XII ASTM D 1120-72

XIII ISO/R 918, DIN 53171, BS 4591/71

XIV ASTM E 537-76

XV ASTM E 537-76

1.6. ОПИС МЕТОДЕ

Поступци неких метода испитивања описани су у међународним и националним стандардима (видети Део други ове методе).

1.6.1. Мерење температуре кључања

1.6.1.1. Одређивање температуре кључања употребом ебулиометра

Видети Део други ове методе.

1.6.1.2. Динамичка метода

Видети методу испитивања А.4. за одређивање напона паре која је дата у овом прилогу.

Бележи се температура кључања уочена на примењеном притиску од 101,325 kPa.

1.6.1.3. Метода дестилације за одређивање температуре кључања (опсега кључања)

Видети Део други ове методе.

Слика 1.

При чему:

А јесте суд за мерење;

В јесте запушач;

C јесте одушка;

D јесте термометар;

E јесте помоћни термометар;

F јесте купатило са течношћу;

G јесте стаклена капилара за узорак спољњег пречника максимално 5 mm, дужине приближно 100 mm, унутрашњег пречника 1 mm и дебљине зида 0,2 mm до 0,3 mm;

H јесте бочна цев.

1.6.1.4. Метода одређивања температуре кључања по Сиволобофу

Узорак се загрева у апарату за одређивање тачке топљења у стакленој капилари за узорке, пречника око 5 mm (видети Слику 1).

Слика 1. приказује тип стандардизованих апарата за одређивање температура топљења и кључања[XVI]. Апарати су направљени од стакла. Све димензије на Слици 1. дате су у милиметрима.

Капилара (за капиларно кључање) затопљена на око 1 cm изнад доњег дела ставља се у капилару за узорак. Ниво до којег се додаје супстанца која се испитује је такав да је затопљени део унутрашње капиларе испод површине течности. Капилара за узорке која садржи капилару за кључање причвршћује се за термометар гуменим каишем или се фиксира држачима са стране (видети Слику 2).

Слика 2.

Поступак према Сиволобофу

Слика 3.

Модификовани поступак

Течност за купатило бира се у складу са температуром кључања. За температуре до 573 K користи се силиконско уље. Течни парафин се користи само до 473 K. Грејање купатила са течношћу се подешава на почетку на пораст температуре од 3 K/min. Течност у купатилу се меша. На око 10 K испод очекиване температуре кључања грејање се смањује, тако да пораст температуре буде мањи од 1 K/min. По постизању температуре кључања, из капиларе за кључање брзо се појављују мехурићи.

Температура кључања је она температура при којој уз моментално хлађење низ мехурића се прекида и течност почне да се пење у капилару. Одговарајућа очитана температура на термометру представља тачку кључања супстанце.

Код модификованог принципа (видети Слику 3) температура кључања се одређује у капилари за одређивање температуре топљења. Капилара се сужава до завршне тачке у дужини од око 2 cm (а) и уноси се мала количина узорка. Отворени крај капиларе је затопљен тако да на дну заостаје мали мехур ваздуха. Загревањем узорка мехур ваздуха се шири (б). Температура кључања је она температура на којој супстанца достигне ниво течности у купатилу (ц).

_____

XVI JIS K 0064

1.6.1.5. Фотоћелијска детекција

Узорак се загрева у капиларној цеви унутар загрејаног металног блока.

Сноп светлости се усмерава кроз супстанцу, кроз одговарајуће отворе у блоку, на прецизно калибрисану фотоћелију.

У току пораста температуре узорка појављују се појединачни мехурићи из капиларе за кључање. Када се постигне температура кључања, број мехурића нагло расте. Ово узрокује промену у интензитету светлости, што бележи фотоћелија и индикатору даје сигнал за заустављање, уз очитавање температуре на платинском отпорном термометру који се налази у блоку.

Ова метода је корисна јер омогућава одређивања температуре кључања испод собне температуре и до 253,15 K (-20°

C) без промена у апарату. Само је потребно инструмент сместити у купатило за хлађење.

1.6.2. Термална анализа

1.6.2.1. Диференцијална термална анализа

Видети Део други ове методе.

1.6.2.2. Диференцијална скенирајућа калориметрија

Видети Део други ове методе.

2. ПОДАЦИ

При малим одступањима од нормалног притиска (максимално ± 5 kPa), температуре кључања се нормализују до T_n помоћу следеће Сидни Јангове једначине са вредношћу бројева:

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

при чему:

Δp јесте разлика: 101,325 - p (обратити пажњу на знак +/-);

p јесте измерени притисак у kPa;

f_T јесте брзина промене температуре кључања са притиском у K/kPa;

T јесте измерена температура кључања у степенима келвина (K);

T_n јесте температура кључања коригована на нормалан притисак у степенима келвина (K).

Фактори корекције температуре (f_T) и једначине за њихову апроксимацију укључени су у међународне и националне стандарде за многе супстанце.

Табела 2: Фактори корекције температуре f_T[XVII]

Температура T (K)	Фактор корекције f_T (K/kPa)
323,15	0,26
348,15	0,28
373,15	0,31
398,15	0,33
423,15	0,35
448,15	0,37
473,15	0,39
498,15	0,41
523,15	0,43
548,15	0,45
573,15	0,47

––––––––––––––

XVII У методи DIN 53171 дате су грубе корекције за растваваче који се користе у индустрији боја и лакова.

3. ИЗВЕШТАЈ

Извештај о испитивању, уколико је могуће, садржи податке о:

– коришћеној методи;

– прецизном опису супстанце (идентитет и нечистоће) и корацима претходних пречишћавања, уколико их је било;

– процени прецизности.

Средња вредност најмање два мерења која су у опсегу процењене тачности (видети Табелу 1) наводи се као температура кључања.

Наводе се измерене температуре кључања и њихове средње вредности, а притисак, односно притисци при којима су извршена мерења наводе се у kPa. Пожељно је да притисак буде близу нормалног атмосферског притиска.

У извештају се наводе сви подаци и напомене релевантне за тумачење резултата, нарочито оне које се односе на нечистоће и физичко стање супстанце.

4. ЛИТЕРАТУРА

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, vol. II.

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

Део други
ДОДАТНИ ТЕХНИЧКИ ПОДАЦИ

Додатни технички подаци могу се пронаћи у следећим стандардима:

1. Одређивање температуре кључања употребом ебулиометра

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

2. Метода дестилације за одређивање температуре кључања (опсега кључања)

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

3. Диференцијална термална анализа и диференцијална скенирајућа калориметрија

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

А.3. РЕЛАТИВНА ГУСТИНА

Део први

1. МЕТОДА ИСПИТИВАЊА

Ова метода заснива се на Упутству за испитивање OECD[1]. Основни принципи методе дати су у литератури [2].

1.1. УВОД

Описане методе за одређивање релативне густине могу се примењивати на чврсте и течне супстанце, без ограничења у погледу њиховог степена чистоће. Различите методе које се користе дате су у Табели 1.

1.2. ДЕФИНИЦИЈЕ И МЕРНЕ ЈЕДИНИЦЕ

Релативна густина D^{20}_{4} за чврсте или течне супстанце јесте однос између масе, запремине супстанце која се испитује (одређене на 20º C) и масе исте запремине воде (одређене на 4º C). Релативна густина нема димензију.

Густина (r) супстанце јесте количник масе (m) и запремине (v) супстанце.

Густина (r) супстанце се у Међународном систему јединица (SI) изражава у kg/m^3.

1.3. РЕФЕРЕНТНЕ СУПСТАНЦЕ[1, 3]

Референтне супстанце се не користе сваки пут када се испитује нова супстанца. Оне првенствено служе за повремену проверу методе и да омогуће поређење са резултатима добијеним другим методама.

1.4. ПРИНЦИП МЕТОДЕ

Користе се четири типа метода.

1.4.1. Метода потиска

1.4.1.1. Ареометар (за течне супстанце)

Довољно тачно и брзо одређивање густине добија се помоћу плутајућих ареометара, код којих се густина течности утврђује на основу дубине потапања која се очитава на градуисаној скали.

1.4.1.2. Хидростатичка вага (за течне и чврсте супстанце)

Разлика између тежине испитиваног узорка мереног у ваздуху и мереног у одговарајућој течности (нпр. у води) користи се за одређивање густине испитиваног узорка.

За одређивање густине чврсте супстанце измерена густина јесте репрезентативна густина само за испитивани узорак. За одређивање густине течности прво се мери маса тела познате запремине (V) у ваздуху, а затим у течности.

1.4.1.3. Метода урањања тела (за течне супстанце)[4]

По овој методи густина течности одређује се из разлике резултата мерења масе течности пре и после зарањања тела познате запремине у течност која се испитује.

1.4.2. Метода пикнометра

За чврсте или течне супстанце могу се користити пикнометри различитих облика са познатим запреминама. Густина се одређује из разлике у маси између пуног и празног пикнометра и његове познате запремине.

1.4.3. Ваздушни упоредни пикнометар (за чврсте супстанце)

Густина чврсте супстанце у било ком облику мери се на собној температури са гасним упоредним пикнометром. Запремина супстанце мери се у ваздуху или у инертном гасу у цилиндру променљиве калибрисане запремине. За прорачун густине узима се једно мерење масе, након мерења запремине.

1.4.4. Осцилујући мерач густине[5, 6, 7]

Густина течности мери се помоћу осцилујућег мерача густине. Механички осцилатор, направљен у облику цеви латиничног слова У (U), вибрира на фреквенцији резонанце осцилатора која зависи од његове масе. Уношење узорка мења фреквенцију резонанце осцилатора. Апарат се калибрише помоћу две течне супстанце познате густине. Ове супстанце се бирају на начин да њихове густине обухватају опсег који се мери.

1.5. КРИТЕРИЈУМИ КВАЛИТЕТА

Примењивост различитих метода које се користе за одређивање релативне густине дата је у Табели.

1.6. ОПИС МЕТОДЕ

У Делу другом ове методе дати су стандарди као пример који се консултују за додатне техничке податке.

Изводе се најмање два мерења на температури од 20° C.

2. ПОДАЦИ

Видети стандарде дате у Делу другом ове методе.

3. ИЗВЕШТАЈ

Извештај о испитивању, уколико је могуће, садржи податке о:

– коришћеној методи;

– прецизном опису супстанце (идентитет и нечистоће) и корацима претходних пречишћавања, уколико их је било.

Релативна густина (D^{20}_{4}) се у извештају наводи у складу са дефиницијом датом у одељку 1.2. ове методе, заједно са физичким стањем мерене супстанце.

У извештају се наводе сви подаци и примедбе важне за тумачење резултата, нарочито подаци о нечистоћама и физичком стању супстанце.

Табела: Примењивост метода

Метода мерења	Густина		Максималан могући динамички вискозитет
	чврсто	течно	
Ареометар[XVIII]		да	5 Pa s
Хидростатичка вага[XIX] а) хемикалије у чврстом стању	да	да	5 Pa s

б) течности			
Метода урањања тела[XX]		да	20 Pa s
Метода пикнометра[XXI] а) хемикалије у чврстом стању б) течности	да	да	500 Pa s
Ваздушни упоредни пикнометар[XXII]	да		
Осцилујући мерач густине		да	5 Pa s

_____

XVIII ISO 387, ISO 649-2, NF T 20-050

XIX ISO 1183 (A), ISO 901 i 758

XX DIN 53217

XXI ISO 3507, ISO 1183 (B), NF T 20-053, ISO 758

XXII DIN 55990, DIN 53243

4. ЛИТЕРАТУРА

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

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

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

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

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

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

7. Riemann, J., Der Einsatz der digitalen Dichtemessung im Brauereilaboratorium, Brauwissenschaft, 1976, vol. 9, p. 253-255.

Део други
ДОДАТНИ ТЕХНИЧКИ ПОДАЦИ

Додатни технички подаци могу се пронаћи у следећим стандардима:

1. Метода потиска

1.1. Ареометар

DIN 12790, ISO 387 Hydrometer; general instructions

DIN 12791 Part I: Density hydrometers; construction, adjustment and use
Part II: Density hydrometers; standardised sizes, designation
Part III: Use and test

ISO 649-2 Laboratory glassware: Density hydrometers for general purpose

NF T 20-050 Chemical products for industrial use – Determination of density of liquids –Areometric method

DIN 12793 Laboratory glassware: range find hydrometers

1.2. Хидростатичка вага

1.2.1. За чврсте супстанце

ISO 1183 Method A: Methods for determining the density and relative density of plastics excluding cellular plastics

NF T 20-049 Chemical products for industrial use – Determination of the density of solids other than powders and cellular products – Hydrostatic balance method

ASTM-D-792 Specific gravity and density of plastics by displacement

DIN 53479 Testing of plastics and elastomers; determination of density

1.2.2 За течне супстанце

ISO 901 ISO 758

DIN 51757 Testing of mineral oils and related materials; determination of density

ASTM D 941-55, ASTM D 1296-67 and ASTM D 1481-62

ASTM D 1298 Density, specific gravity or API gravity of crude petroleum and liquid petroleum products by hydrometer method

BS 4714 Density, specific gravity or API gravity of crude petroleum and liquid petroleum products by hydrometer method

1.3. Метода урањања тела

DIN 53217 Testing of paints, varnishes and similar coating materials; determination of density; immersed body method

2. Метода пикнометра

2.1. За течне супстанце

ISO 3507 Pycnometers

ISO 758 Liquid chemical products; determination of density at 20 ^{o}C

DIN 12797 Gay-Lussac pycnometer (for non-volatile liquids which are not too viscous)

DIN 12798 Lipkin pycnometer (for liquids with a kinematic viscosity of less than 100 10^{-6} m^2s^{-1} at 15 ^{o}C)

DIN 12800 Sprengel pycnometer (for liquids as DIN 12798)

DIN 12801 Reischauer pycnometer (for liquids with a kinematic viscosity of less than 100. 10^{-6} m^2 s^{-1} at 20 ^{o}C, applicable in particular also to hydrocarbons and aqueous solutions as well as to liquids with higher vapour pressure, approximately 1 bar at 90 ^{o}C)

DIN 12806 Hubbard pycnometer (for viscous liquids of all types which do not have too high a vapour pressure, in particular also for paints, varnishes and bitumen)

DIN 12807 Bingham pycnometer (for liquids, as in DIN 12801)

DIN 12808 Jaulmes pycnometer (in particular for ethanol – water mixture)

DIN 12809 Pycnometer with ground-in thermometer and capillary side tube (for liquids which are not too viscous)

DIN 53217 Testing of paints, varnishes and similar products; determination of density by pycnometer

DIN 51757 Point 7: Testing of mineral oils and related materials; determination of density

ASTM D 297 Section 15: Rubber products – chemical analysis

ASTM D 2111 Method C: Halogenated organic compounds

BS 4699 Method for determination of specific gravity and density of petroleum products (graduated bicapillary pycnometer method)

BS 5903 Method for determination of relative density and density of petroleum products by the capillary – stoppered pycnometer method

NF T 20-053 Chemical products for industrial use – Determination of density of solids in powder and liquids – Pyknometric method

2.2. За чврсте супстанце

ISO 1183 Method B: Methods for determining the density and relative density of plastics excluding cellular plastics

NF T 20-053 Chemical products for industrial use – Determination of density of solids in powder and liquids – Pyknometric method

DIN 19683 Determination of the density of soils

3. Ваздушни упоредни пикнометар

DIN 55990 Part 3: Prüfung von Anstrichstoffen und ähnlichen Beschichtungsstoffen; Pulverlack; Bestimmung der Dichte

DIN 53243 Anstrichstoffe; chlorhaltige Polymere; Prüfung

А.4. НАПОН ПАРЕ

Део први

1. МЕТОДА ИСПИТИВАЊА

Ова метода заснива се на Упутству за испитивање OECD 104 (2004).

1.1. УВОД

Метода А.4.[1], у односу на ранију верзију, садржи додатну методу, Методу ефузије: изотермалне термогравиметрије, која је намењена за супстанце са врло ниским напоном паре (до 10^{-10} Pa). Услед потреба за поступцима, посебно кад се ради о одређивању напона паре за супстанце са ниским напоном паре, поново се оцењују и други поступци у оквиру ове методе у односу на друге опсеге примене.

У термодинамичкој равнотежи напон паре чисте супстанце зависи искључиво од температуре. Основни принципи дати су у литератури[2, 3].

Не постоји јединствени поступак мерења који се примењује на целокупни опсег напона паре, који се креће од испод 10^{-10} Pa до 10^{5} Pa. Ова метода обухвата осам метода за мерење напона паре, које се могу применити у различитим распонима напона паре. У Табели 1. која је дата у овој методи дато је поређење различитих метода у односу на њихову примену и мерни опсег. Ове методе могу се применити само на једињења која се не разграђују у условима испитивања. Ако се напон паре из техничких разлога не може одредити неком од експерименталних метода, он се процењује, а препоручена метода процене наведена је у Додатку који је дат у Делу другом ове методе.

1.2. ДЕФИНИЦИЈЕ И МЕРНЕ ЈЕДИНИЦЕ

Напон паре супстанце јесте притисак засићене паре изнад чврсте или течне супстанце.

У Међународном систему јединица SI јединица за притисак која се користи за ове потребе јесте паскал (Pa).

Мерне јединице које су се раније користиле, заједно са факторима њихове конверзије, су:

1 Torr = 1 mm Hg = $1{,}333 \times 10^{2}$ Pa

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

1 бар = 10^{5} Pa

SI јединица за температуру јесте келвин (K). За конверзију Целзијусових степени у келвине користи се формула:

T = t + 273,15

при чему:

T јесте температура у келвинима или термодинамичка температура;

t јесте температура у Целзијусовим степенима.

Табела 1.

Метода мерења	Супстанце		Процењена поновљивост	Процењена репро-дуктивност	Препоруче-ни опсег
	Чврста супстанца	Течност			
Динамичка метода	ниска тачка топљења	Да	до 25% 1% до 5%	до 25% 1% до 5%	10^{3} Pa до 2×10^{3} Pa 2×10^{3} Pa до 10^{5} Pa
Статичка метода	Да	Да	5% до 10%	5% до 10%	10 Pa до 10^{5} Pa 10^{-2} Pa до 10^{5} Pa [1]
Метода са изотензиоскопом	Да	Да	5% до 10%	5% до 10%	10^{2} Pa до 10^{5} Pa
Метода ефузије: мерење напона паре	Да	Да	5% до 20%	до 50%	10^{-3} Pa до 1 Pa
Метода ефузије: Кнудсенова ћелија	Да	Да	10% до 30%	–	10^{-10} Pa до 1 P

Метода ефузије: изотермална термогравиметрија	Да	Да	5% до 30%	до 50%	10^{-10} Pa до 1 Pa
Метода засићења гаса	Да	Да	10% до 30%	до 50%	10^{-10} Pa до 10^{3} Pa
Метода са ротирајућом куглицом	Да	Да	10% до 20%	–	10^{-4} Pa до 0,5 Pa
[1] Ако се користи капацитивни манометар.					

1.3. ПРИНЦИП МЕРЕЊА

Напон паре се, углавном, одређује при различитим температурама. У ограниченом распону температуре, логаритам напона паре чисте супстанце јесте линеарна функција реципрочне термодинамичке температуре, у складу са поједностављеном Клапејрон – Клаузијусовом једначином:

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

при чему:

p јесте напон паре у паскалима;

ΔHv јесте топлота испаравања у J mol^{-1};

R јесте универзална гасна константа која износи 8,314 J mol^{-1} K^{-1};

T јесте температура у K.

1.4. РЕФЕРЕНТНЕ СУПСТАНЦЕ

Није потребно користити референтне супстанце. Оне првенствено служе за повремену проверу учинка методе и омогућавају поређење са резултатима добијеним другим методама.

1.5. ОПИС МЕТОДЕ

1.5.1. Динамичка метода (Котрелова метода)

1.5.1.1. Принцип методе

Напон паре одређује се мерењем температуре кључања супстанце при различитим задатим притисцима између око 10^3 Pa и 10^5 Pa. Ова метода препоручује се и за одређивање температуре кључања. У ту сврху се користи до температуре од 600 K. Температура кључања течности је за приближно 0,1 °C виша на дубини од 3 cm до 4 cm него на површини због хидростатичког притиска течности у колони. Код Котрелове методе[4] термометар се налази у пари изнад површине течности, а течност која кључа непрекидно се пумпа преко главе термометра. Глава термометра прекрива се танким слојем течности која је у равнотежи са паром при атмосферском притиску. Термометар тако показује стварну тачку кључања без грешака услед прегревања или хидростатичког притиска. Оригинална Котрел пумпа приказана је на Слици 1. која је дата у овој методи. Цев A садржи течност која кључа. Платинаста жица B утиснута у дно омогућава равномерно кључање. Бочна цевчица C води до кондензатора, док поклопац D онемогућава да хладни кондензат дође до термометра E. Кад течност у цеви A кључа, мехурићи и течност који доспеју у левак пролазе кроз два крака пумпе F и преливају се преко главе термометра.

Слика 1.

Котрелова пумпа (4)

Слика 2.

A: Термопар
B: Вакуумска пуферска запремина
C: Мерач притиска
D: Вакуум
E: Мерна тачка
F: Грејни елемент око 150 W

1.5.1.2. Апаратура

На Слици 2. која је дата у овој методи приказана је апаратура која ради према Котреловом принципу. Састоји се од цеви са простором за кључање у доњем делу, хладњаком у средњем делу и испустом и прирубницом у горњем делу. Котрелова пумпа смештена је у простору за кључање, који се загрева електричним грејачем. Температура се мери термопаром или отпорним термометром, који се умеће кроз прирубницу на врху. Испуст је спојен на систем регулације притиска. Овај последњи састоји се од вакуумске пумпе, пуферске запремине, маностата за подешавање дотока азота за регулацију притиска и манометра.

1.5.1.3. Поступак мерења

Супстанца се ставља у простор за кључање. Проблеми се могу јавити у случају кад чврсте супстанце нису прашкасте, али то је некад могуће решити загревањем облоге хладњака. Апарат се печати код прирубнице и из супстанце се извлачи ваздух. Овом методом не могу се мерити супстанце које пене.

Затим се подешава најнижи жељени притисак и укључује загревање. Истовремено се температурни сензор прикључује на штампач.

Равнотежа се постиже када се при сталном притиску бележи стална температура кључања. Посебно се води рачуна да се избегне бурно кључање. На хладњаку долази до потпуне кондензације. Код одређивања притиска паре чврстих супстанци с ниском тачком топљења води се рачуна да не дође до зачепљења кондензатора.

Кад се забележи тачка равнотеже, подешава се виши притисак. Поступак се наставља на исти начин док се не дође до 105 Pa (укупно око 5 до 10 мерних тачака). Ради провере, потребно је понављати тачке равнотеже при опадајућем притиску.

1.5.2. Статичка метода

1.5.2.1. Принцип методе

Код статичке методе[5] напон паре у термодинамичкој равнотежи одређује се при задатој температури. Ова метода погодна је за супстанце и за вишекомпонентне течности и чврсте материјале у распону од 10^{-1} Pa до 10^{5} Pa, а уз посебан опрез, и у распону од 1 Pa до 10 Pa.

1.5.2.2. Апаратура

Уређај се састоји од купатила са сталном температуром (прецизност ± 0,2 K), посуде за узорак спојене са вакуумском цеви, манометра и система за регулацију притиска. Комора са узорком (Слика 3а која је дата у овој методи) повезана је са

вакуумском цеви преко вентила и диференцијалног манометра (U-цев која садржи одговарајућу манометарску течност) који служи као нулти показатељ. У манометру се могу користити жива, силикони и фталати, зависно од распона притиска и хемијских својстава испитиване супстанце. Употреба живе се избегава кад год је то могуће имајући у виду њену штетност по животну средину. Испитивана супстанца се не сме приметно растварати у течности U-цеви нити са њом реаговати. Уместо U-цеви користи се манометар (Слика 3б која је дата у овој методи). Жива се у манометру користи у распону од нормалног притиска до 10^2 Pa, док су силиконске течности и фталати погодни за притиске испод 10^2 Pa до 10 Pa. Постоје и други мерачи притиска који се могу користити испод 10^2 Pa, а манометри са мембраном погодни за загревање могу се користити чак и испод 10^{-1} Pa. Температура се мери на спољном зиду посуде са узорком или у самој посуди.

1.5.2.3. Поступак мерења

Користећи апарат приказан на Слици 3а, U-цев се напуни одабраном течношћу из које је пре очитавања потребно одстранити гасове на повишеној температури. Испитивана супстанца стави се у апаратуру и из ње се извуче ваздух на сниженој температури. У случају вишекомпонентних узорака температура треба да буде довољно ниска да не дође до промене састава материјала. Успостављање равнотеже убрзава се мешањем. Узорак се хлади течним азотом или сувим ледом, али се пази да не дође до кондензације ваздуха или течности у пумпи. Отвори се вентил изнад посуде с узорком и неколико минута врши вакумирање како би се уклонио ваздух. Поступак извлачења ваздуха се, према потреби, понавља више пута.

Слика 3а

1: Испитивана супстанца
2: Парна фаза
3: Високовакуумски вентил
4: U-цев (помоћни манометар)
5: Манометар
6: Термостатско купатило
7: Уређај за мерење температуре
8: Вод до вакуумске пумпе
9: Вентилација/азот

Слика 3б

1: Испитивана супстанца
2: Парна фаза
3: Високовакуумски вентил
4: Манометар
5: Показивач притиска
6: Термостатско купатило
7: Уређај за мерење температуре

Кад се узорак загрева са затвореним вентилом, напон паре се повећава. Тиме се мења равнотежа течности у U-цеви. Да би се повратила равнотежа, у апаратуру се доводи азот или ваздух док се индикатор диференцијалног притиска не врати на нулу. Притисак који је за то потребан очитава се на прецизном манометру. Тај притисак одговара напону паре супстанце на температури мерења. Ако се користи апаратура описана на Слици 3б, напон паре се директно очитава.

Напон паре се одређује у одговарајуће малим температурним интервалима (укупно око 5 до 10 мерних тачака) до жељене максималне температуре.

Ради провере, понављају се очитавања на ниским температурама. Ако се вредности добијене при поновљеним очитавањима не подударају са кривом за растућу температуру, могући разлози су:

1) у узорку још има ваздуха (нпр. у случају јако вискозних материјала) или супстанци са ниском тачком кључања који се ослобађају приликом загревања;

2) супстанца хемијски реагује у температурном опсегу које се испитује (нпр. разлагање, полимеризација).

1.5.3. Изотензиоскоп

1.5.3.1. Принцип методе

Изотензиоскоп[6] се заснива на принципу статичке методе. Ова метода подразумева стављање узорка у балон који се одржава на сталној температури и који је спојен на манометар и вакуумску пумпу. Нечистоће које су испарљивије од испитиване супстанце уклањају се вакумирањем ваздуха на смањеном притиску. Напон паре узорка при одабраним температурама изједначава се с познатим притиском инертног гаса. Изотензиоскоп је првобитно израђен за мерење напона паре неких течних угљоводоника, али је погодан и за испитивање чврстих супстанци. Метода по правилу није погодна за вишекомпонентне системе. Мале грешке у резултатима могуће су код узорака који садрже неиспарљиве нечистоће. Препоручени распон је од 10^2 Pa до 10^5 Pa.

1.5.3.2. Апаратура

Пример мерног уређаја приказан је на Слици 4. која је дата у овој методи. Детаљан опис дат је у литератури[6].

1.5.3.3. Поступак мерења

Кад се испитују течности, сама супстанца служи као течност помоћног манометра. У изотензиоскоп стави се количина течности која је потребна да се напуни балон и краћи крак манометра. Изотензиоскоп се спаја на вакуумски систем како би се уклонио ваздух, а затим се напуни азотом. Уклањање и испирање система понавља се два пута како би се уклонио преостали кисеоник. Изотензиоскоп се поставља у водораван положај тако да се узорак у танком слоју рашири по балону и манометру. Притисак система смањи се на 133 Pa и узорак полако загрева до кључања (уклањање растворених гасова). Изотензиоскоп се затим положи тако да се узорак врати у балон и напуни краћи крак манометра. Притисак се одржава на 133 Pa. Издужени врх балона с узорком загрева се на малом пламену док се пара која се ослобађа из узорка не рашири довољно да потисне део узорка из горњег дела балона и крака манометра у манометар, стварајући простор испуњен паром у коме нема азота. Изотензиоскоп се затим ставља у купатило са сталном температуром и притисак азота подешава док се не изједначи с притиском паре узорка. У равнотежи је притисак азота једнак притиску паре супстанце.

Слика 4.

У случају чврстих супстанци, зависно од опсега притиска и температуре, користе се манометарске течности као што су силиконске течности или фталати. Манометарска течност из које је извучен ваздух ставља се у проширење на дужем краку изотензиоскопа. Након тога чврста супстанца која се испитује ставља се у балон за узорак и из ње се извлачи ваздух на повишеној температури. Изотензиоскоп се затим нагне тако да манометарска течност отиче у U-цев.

1.5.4. Метода ефузије: мерење напона паре[7]

1.5.4.1. Принцип методе

Узорак испитиване супстанце загреје се у малој пећи и стави у звоно под вакумом. Пећ се прекрије поклопцем на коме се налазе рупице познатог пречника. Пара супстанце која излази кроз једну од рупица удара о тас врло осетљиве ваге, која је такође смештена у звону. Код неких конструкција тас ваге је уметнут у кућиште за хлађење, које процесом вођења топлоте обезбеђује расипање топлоте према спољној средини, и хлади се исијавањем, тако да се излазећа пара на њој кондензује. Момент млаза паре делује као сила на вагу. Напон паре се одређује на два начина: директно из силе која удара о тас ваге или из брзине испаравања помоћу Херц–Кнудсенове једначине[2]:

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

при чему:

G јесте брзина испаравања (kg s^{-1} m^{-2});

M јесте моларна маса (g mol^{-1});

T јесте температура (K);

R јесте универзална гасна константа (J mol^{-1} K^{-1});

P јесте напон паре (Pa).

Препоручени распон који се мери овом методом је од 10^{-3} Pa до 1 Pa.

1.5.4.2. Апаратура

Апаратура за примену општег принципа мерења приказана је на Слици 5. која је дата у овој методи:

Слика 5.

1.5.5. Метода ефузије: Кнудсенова ћелија

1.5.5.1. Принцип методе

Ова метода заснива се на процени масе испитиване супстанце која у облику паре истиче кроз микроотвор Кнудсенове ћелије[8] у јединици времена у условима високог вакуума. Маса паре се добија одређивањем губитка масе ћелије или кондензацијом паре на ниској температури и хроматографским одређивањем количине супстанце која је прешла у пару. Напон паре израчунава се применом Херц – Кнудсеновог односа (видети одељак 1.5.4.1. ове методе) уз факторе корекције који зависе од параметара апарата[9]. Препоручени опсег је од 10^{-10} Pa до 1 Pa[10, 11, 12, 13, 14].

1.5.5.2. Апаратура

Апаратура за примену општег принципа мерења приказана је на Слици 6. која је дата у овој методи.

Слика 6.

1: Прикључак на вакуум
2: Отвори платинастог отпорничког термометра или мерење и контрола температуре
3: Поклопац резервоара за вакуум
4: О-прстен
5: Алуминијумски резервоар за вакуум
6: Уређај за постављање и скидање ефузијских ћелија
7: Поклопац са навојем
8: Лептир матице
9: Вијци
10: Ефузијске ћелије од нерђајућег челика
11: Кертриџ грејача

1.5.6. Метода ефузије: изотермална термогравиметрија

1.5.6.1. Принцип методе

Ова метода заснива се на одређивању брзина испаравања испитиване супстанце при повишеним температурама и атмосферском притиску применом термогравиметрије[10, 15, 16, 17, 18, 19, 20]. Брзине испаравања vT добијају се излагањем одабраног једињења атмосфери споре струје инертног гаса и праћењем губитка масе при дефинисаним изотермалним температурама T у степенима келвина у одговарајућим временским периодима. Напони паре pT израчунавају се из вредности vT на основу линеарног односа између логаритма напона паре и логаритма брзине испаравања. Ако је потребно, направи се екстраполација на температуре од 20° C и 25° C регресионом анализом log pT узависности од 1/T. Ова метода је погодна за супстанце са ниским напоном паре чак до 10^{-10} Pa (10^{-12} mbar), с тим да чистоћа супстанци треба да буде близу 100% како би се избегло погрешно тумачење измерених губитака масе.

1.5.6.2. Апаратура

Апаратура за примену општег принципа мерења приказана је на Слици 7. која је дата у овој методи.

Слика 7.

Преко носача узорка окаченог на микроваги у комори са контролисаном температуром пушта се струја сувог азота која са собом односи молекуле паре испитиване супстанце. Гасна струја се по изласку из коморе прочишћава у сорпцијској јединици.

1.5.6.3. Поступак мерења

Испитивана супстанца равномерно се нанесе у слоју на површину храпаве стаклене плоче. У случају чврстих супстанци плоча се равномерно накваси раствором супстанце у одговарајућем растварачу и осуши у инертној атмосфери. Код мерења, плоча са слојем испитиване супстанце окачи се у термогравиметријски анализатор и након тога губитак масе се непрекидно мери у функцији времена.

Брзина испаравања vT при одређеној температури израчунава се из губитка масе Δm плоче са узорком помоћу формуле:

$$v_T = \frac{\Delta M}{F \times t}\left(gcm^{-2}h^{-1}\right)$$

при чему:

F јесте површина нанесене испитиване супстанце, по правилу површина плоче с узорком;

t јесте време губитка масе Δm.

Напон паре pT израчунава се на основу функције брзине испаравања vT:

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

при чему:

C и D јесу специфичне константе експерименталне апаратуре, које зависе од пречника мерне коморе и брзине протока гаса.

Константе C и D одређују се једном, мерењем низа једињења познатог напона паре и регресијом log pT у зависности од log vT[11, 21, 22].

Однос између напона паре pT и температуре T у степенима келвина произлази из формуле:

$log\ pT = A + B \times 1/T$

при чему:

A и B јесу константе добијене регресијом log pT у зависности од 1/T.

Уз помоћ ове једначине напон паре се израчунава за било коју другу температуру екстраполацијом.

1.5.7. Метода засићења гаса[23]

1.5.7.1. Принцип методе

Инертни гас се при собној температури проводи кроз узорак испитиване супстанце или преводи преко њега познатом

брзином, која је довољно ниска да се постигне засићење. Постизање засићења у гасној фази од пресудне је важности. Супстанца која се преноси одваја се, углавном помоћу носача, и одређује се њена количина. Као алтернатива за одвајања паре и накнадну анализу, за квантитативно одређивање количине пренесене супстанце могу се користити аналитички поступци, као што је гасна хроматографија. Код израчунавања напона паре полази се од претпоставке да важи закон о идеалном гасу и да је укупни притисак смеше гасова једнак збиру притисака компонената гаса. Парцијални притисак испитиване супстанце, тј. напон паре, израчунава се из познате укупне запремине гаса и масе пренесеног материјала.

Поступак засићења гаса примењује се на чврсте и течне супстанце. Користи се за напон паре до најмање 10^{-10} Па[10,11,12,13,14]. Ова метода је најпоузданија при напонима паре испод 10^3 Па. Изнад 10^3 Па генерално се добијају прецењене вредности притиска паре, вероватно због стварања аеросола. Будући да се мерења напона паре врше на собној температури, нема потребе за екстраполацијом података од високих температура која би могла довести до озбиљних грешака.

1.5.7.2. Апаратура

Овај поступак захтева коришћење кућишта са сталном температуром. На Слици 8. која је дата у овој методи приказано је кућиште у које су смештена три држача за чврсте узорке и три држача за течне узорке, што омогућава истовремену анализу три чврста узорка или три течна узорка. Температура се одржава у границама ± 0,5° C или мање.

Слика 8.

Као инертни носећи гас обично се користи азот, али понекад је потребан и неки други гас[24]. Носећи гас треба да буде сув. Гасна струја се дели на 6 мањих струја, које се регулишу игличастим вентилима (отвора приближно 0,79 mm), и одводи у кућиште бакарним цевима унутрашњег пречника 3,8 mm. Кад се температура устали, гас протиче кроз узорак и сепаратор са носачем и излази из кућишта.

Чврсти узорци стављају се у стаклену цевчицу унутрашњег пречника 5 mm између чепова од стаклене вуне (видети Слику 9. која је дата у овој методи). На Слици 10. која је дата у овој методи приказан је држач течног узорка и систем носача. Метода мерења напона паре течности која се најлакше понавља је да се течност нанесе на стаклене куглице или на инертни носач, као што је силика гел, и држач напуни тим куглицама. Друга могућност је да се носећи гас преводи преко грубог металног сита и продувава кроз колону течне испитиване супстанце.

Слика 9.

Слика 10.

Систем носача састоји се од предњег и помоћног дела. При врло ниском напону паре носач задржава само мале количине супстанце и адсорпција на стакленој вуни и стакленој цевчици између узорка и носача може представљати озбиљан проблем.

Сепаратори хлађени чврстим CO_2 представљају још један ефикасан начин сакупљања пара. Они не стварају контрапритисак на колони за засићење, а одвојени материјал се лако квантитативно уклања.

1.5.7.3. Поступак мерења

Брзина протока излазног гаса носача мери се при собној температури. Током експеримента често се проверава брзина протока како би се добила тачна вредност укупне запремине гаса носача. Пожељно је непрекидно праћење мерачем протока. Да би се постигло засићење гасне фазе понекад је потребно знатно време контакта, што подразумева и прилично мале брзине протока гаса[25].

На крају експеримента, предњи и помоћни део носача одвојено се анализирају. Једињење се из сваког дела испира додавањем растварача. Настали раствори квантитативно се анализирају ради одређивања испране масе из сваког дела. Избор аналитичког метода (као и избор носача и растварача за испирање) зависи од природе испитиваног материјала. Ефикасност испирања одређује се убризгавањем познате количине узорка на носач, испирањем супстанце и анализирањем добијене количине. Важно је да се код провере ефикасности испирања користи концентрација која је једнака или слична концентрацији узорка у условима испитивања.

Да би се осигурало засићење гаса носача испитиваном супстанцом, користе се три различите брзине протока гаса. Ако се израчунати напон паре не мења са променом брзине протока, сматра се да је гас засићен.

Напон паре израчунава се помоћу једначине:

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

при чему:

P јесте напон паре (Pa);

W јесте маса испарене испитиване супстанце (g);

V јесте запремина засићеног гаса (m^3);

R јесте универзална гасна константа која износи 8,314 ($J\ mol^{-1}\ K^{-1}$);

T јесте температура (K);

M јесте моларна маса испитиване супстанце ($g\ mol^{-1}$).

Измерене запремине се коригују за разлику у притиску и температури између мерача протока и засићивача.

1.5.8. Метода са ротирајућом куглицом

1.5.8.1. Принцип методе

Код ове методе користи се вискозиметар на ротору чији се мерни елемент састоји од мале челичне куглице стабилизоване у магнетном пољу која се врти под утицајем окретног поља[26,27,28]. Пријемни калемови омогућавају мерење брзине обртања. Када куглица постигне одређену ротациону брзину, обично око 400 обртаја у секунди, прекида се даље довођење енергије и наступа успоравање услед трења гасова. Опадање брзине обртања мери се као функција времена. Напон паре изводи се из успоравања челичне куглице које зависи од притиска. Препоручени распон је од 10^{-4} Pa до 0,5 Pa.

1.5.8.2. Апаратура

Експериментална апаратура приказана је на Слици 11. која је дата у овој методи. Мерна глава постављена је у термостатски регулисаном кућишту са тачношћу од 0,1° C. Посуда за узорак постављена је у засебном, такође термостатски регулисаном кућишту, са тачношћу од 0,1° C. Сви остали делови апаратуре држе се на вишој температури како би се спречила кондензација. Читава апаратура спојена је на високовакуумски систем.

Слика 11.

2. ПОДАЦИ И ИЗВЕШТАВАЊЕ

2.1. ПОДАЦИ

Напон паре код сваке од наведених метода одређује се за најмање две температуре. Пожељно је одабрати три или више температура у распону од 0° C до 50° C како би се проверила линеарност криве напона паре. У случају методе ефузије (Кнудсенова ћелија и изотермална термогравиметрија) и методе засићења гаса, за мерење се уместо опсега температуре од 0° C до 50° C препоручује опсег од 120° C до 150° C.

2.2. ИЗВЕШТАЈ О ИСПИТИВАЊУ

Извештај о испитивању садржи податке о:

– примењеној методи;

– прецизној спецификацији супстанце (идентитет и нечистоће) и поступку претходног пречишћавања, уколико је предвиђен;

– најмање две вредности напона паре и температуре (пожељно је три или више) у распону од 0° C до 50° C (односно од 120° C до 150° C);

– најмање једна температура треба да буде 25° C или нижа, ако је то технички изводљиво код одабране методе;

– свим необрађеним подацима;

– криви log p у зависности од 1/T;

– процени напона паре на 20° C или 25° C.

Уколико се уочи прелазно стање супстанце (измена у друго агрегатно стање или разлагање), потребно је навести податке о:

– врсти промене;

– температури на којој долази до промене при атмосферском притиску;

– напону паре на 10° C и 20° C испод температуре преласка и 10° C и 20° C изнад те температуре (осим у случају преласка из чврстог у гасовито стање).

У извештају се наводе сви подаци и примедбе битне за тумачење резултата, нарочито у вези с нечистоћама и агрегатним стањем супстанце.

3. ЛИТЕРАТУРА

1. Службени лист Европске заједнице, L 383 A, 26–47 (1992).

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

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

4. Glasstone, S. (1946). Textbook of Physical Chemistry, 2nd ed., Van Nostrand Company, New York.

5. NF T 20-048 AFNOR (September 1985). Chemical products for industrial use – Determination of vapour pressure of solids and liquids within a range from 10–1 to 105 Pa – Static method.

6. ASTM D 2879-86, Standard test method for vapour pressure – temperature relationship and initial decomposition temperature of liquids by isoteniscope.

7. NF T 20-047 AFNOR (September 1985). Chemical products for industrial use – Determination of vapour pressure of solids and liquids within range from 10–3 to 1 Pa – Vapour pressure balance method.

8. Knudsen, M. (1909). Ann. Phys. Lpz., 29, 1979; (1911), 34, 593.

9. Ambrose, D., Lawrenson, I.J., Sprake, C.H.S. (1975). J. Chem. Thermodynamics 7, 1173.

10. Schmuckler, M.E., Barefoot, A.C., Kleier, D.A., Cobranchi, D.P. (2000), Vapor pressures of sulfonylurea herbicides; Pest Management Science 56, 521-532.

11. Tomlin, C.D.S. (ed.), The Pesticide Manual, Twelfth Edition (2000).

12. Friedrich, K., Stammbach, K., Gas chromatographic determination of small vapour pressures determination of the vapour pressures of some triazine herbicides. J. Chromatog. 16 (1964), 22-28.

13. Grayson, B.T., Fosbraey, L.A., Pesticide Science 16 (1982), 269-278.

14. Rordorf, B.F., Prediction of vapor pressures, boiling points and enthalpies of fusion for twenty-nine halogenated dibenzo-p-dioxins, Thermochimia Acta 112 Issue 1 (1987), 117-122.

15. Gückel, W., Synnatschke, G., Ritttig, R., A Method for Determining the Volatility of Active Ingredients Used in Plant Protection; Pesticide Science 4 (1973) 137-147.

16. Gückel, W., Synnatschke, G., Ritttig, R., A Method for Determining the Volatility of Active Ingredients Used in Plant Protection II. Application to Formulated Products; Pesticide Science 5 (1974) 393-400.

17. Gückel, W., Kaestel, R., Lewerenz, J., Synnatschke, G., A Method for Determining the Volatility of Active Ingredients Used in Plant Protection. Part III: The Temperature Relationship between Vapour Pressure and Evaporation Rate; Pesticide Science 13 (1982) 161-168.

18. Gückel, W., Kaestel, R., Kroehl, T., Parg, A., Methods for Determining the Vapour Pressure of Active Ingredients Used in Crop Protection. Part IV: An Improved Thermogravimetric Determination Based on Evaporation Rate; Pesticide Science 45 (1995) 27-31.

19. Kroehl, T., Kaestel, R., Koenig, W., Ziegler, H., Koehle, H., Parg, A., Methods for Determining the Vapour Pressure of Active Ingredients Used in Crop Protection. Part V: Thermogravimetry Combined with Solid Phase MicroExtraction (SPME); Pesticide Science, 53 (1998) 300-310.

20. Tesconi, M., Yalkowsky, S.H., A Novel Thermogravimetric Method for Estimating the Saturated Vapor Pressure of Low-Volatility Compounds; Journal of Pharmaceutical Science 87(12) (1998) 1512-20.

21. Lide, D.R. (ed.), CRC Handbook of Chemistry and Physics, 81st ed. (2000), Vapour Pressure in the Range – 25° C to 150° C.

22. Meister, R.T. (ed.), Farm Chemicals Handbook, Vol. 88 (2002).

23. 40 CFR, 796. (1993). pp 148-153, Office of the Federal Register, Washington DC.

24. Rordorf B.F. (1985). Thermochimica Acta 85, 435.

25. Westcott et al. (1981). Environ. Sci. Technol. 15, 1375.

26. Messer G., Röhl, P., Grosse G., and Jitschin W. (1987). J. Vac. Sci. Technol. (A), 5(4), 2440.

27. Comsa G., Fremerey J.K., and Lindenau, B. (1980). J. Vac. Sci. Technol. 17(2), 642.

28. Fremerey, J.K. (1985). J. Vac. Sci. Technol. (A), 3(3), 1715.

Део други

ДОДАТАК

МЕТОДА ПРОЦЕНЕ

1. УВОД

Процењене вредности напона паре могу се користити за:

– доношење одлука о томе која експериментална метода је одговарајућа,

– навођење процењене или граничне вредности ако се експериментална метода не користи из техничких разлога.

2. МЕТОДА ПРОЦЕНЕ

Напон паре течности и чврстих супстанци процењује се применом модификоване Вотсонове корелације[1]. Једини експериментални податак који је потребан јесте нормална тачка кључања. Метода се примењује у опсегу притиска од 10^5 Pa до 10^{-5} Pa.

Детаљне информације о овој методи дате су у литератури[2]. Видети и осталу литературу [3].

3. ПОСТУПАК ИЗРАЧУНАВАЊА

Напон паре израчунава се на следећи начин:

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

при чему:

T јесте изабрана температура;

Tb јесте нормална тачка кључања;

Pvp јесте напон паре на температури T;

ΔHvb јесте топлота испаравања;

ΔZb јесте фактор компресибилности (процењен на 0,97);

m јесте емпиријски фактор који зависи од агрегатног стања на релевантној температури.

И:

$$\frac{\Delta H_{vb}}{T_b} = K_F(8.75) + RlnT_b$$

при чему:

K_F јесте емпиријски фактор који узима у обзир поларност супстанце. Фактори K_F за неколико врста спојева дати су у литератури[2].

Могу се наћи подаци где је дата тачка кључања при сниженом притиску. У том случају напон паре израчунава се на следећи начин:

$$lnP_{vp} \approx lnP_1 \frac{\Delta H_{v1}}{\Delta Z_b RT_1}\left[1-\left(3-2\frac{T}{T_1}\right)^m \frac{T_1}{T}+2m\left(3-2\frac{T}{T_1}\right)^{m-1} ln\frac{T}{T_1}\right]$$

при чему:

T_1 јесте тачка кључања при сниженом притиску P_1.

4. ИЗВЕШТАЈ

Када се користи метода процене, у извештају се детаљно документује читав поступак израчунавања.

5. ЛИТЕРАТУРА

1. Watson, K.M. (1943). Ind. Eng. Chem, 35, 398.

2. Lyman, W.J., Reehl, W.F., Rosenblatt, D.H. (1982). Handbook of Chemical Property Estimation Methods, McGraw-Hill.

3. OECD Environmental Monograph No.67. Application of Structure-Activity Relationships to the Estimation of Properties Important in Exposure Assessment (1993).

A.5. ПОВРШИНСКИ НАПОН

1. МЕТОДА ИСПИТИВАЊА

Ова метода заснива се на Упутству за испитивање OECD[1]. Основни принципи методе дати су у литератури[2].

1.1. УВОД

Описане методе примењују се код мерења површинског напона водених раствора.

Пре испитивања супстанце корисно је имати податке о њеној: растворљивости у води, структури, способности да хидролизује и вредности критичне концентрације за формирање мицела.

Описане методе могу се применити за већину супстанци, без ограничења у погледу степена њихове чистоће.

Мерење површинског напона методом прстенастог тензиометра ограничено је на водене растворе динамичког вискозитета мањег од 200 mPa s.

1.2. ДЕФИНИЦИЈЕ И МЕРНЕ ЈЕДИНИЦЕ

Површински напон јесте енталпија слободне површине по јединици површине.

Површински напон се изражава као:

N/m у Међународном систему јединица (SI) или

mN/m Међународном систему јединица (SI подјединица);

при чему је:

1 N/m = 10^3 din/cm или

1 mN/m = 1 din/cm у застарелом CGS систему.

1.3. РЕФЕРЕНТНЕ СУПСТАНЦЕ

Референтне супстанце се не користе сваки пут када се испитује нова супстанца. Оне првенствено служе за повремену проверу методе и да омогуће поређење са резултатима добијеним другим методама.

Референтне супстанце које покривају широк опсег површинских напона дате су у литератури[1, 3].

1.4. ПРИНЦИП МЕТОДЕ

Методе се заснивају на мерењу максималне силе коју је неопходно вертикално усмерити на стремен (узенгију) или прстен у контакту са површином течности која се испитује и која се налази у мерној посуди, да би се одвојили од те површине или је усмерити на плочу чија је ивица у контакту са површином ради извлачења формираног танког филма.

Супстанце које су растворне у води при најмањој концентрацији од 1 mg/L испитују се у воденом раствору при само једној концентрацији.

1.5. КРИТЕРИЈУМИ КВАЛИТЕТА

Ове методе дају већу прецизност од прецизности која се очекује са аспекта захтева који се односе на животну средину.

1.6. ОПИС МЕТОДЕ

Припреми се раствор супстанце у дестилованој води. Концентрација раствора треба да буде 90% засићеног раствора супстанце у води. Када концентрација прелази 1 g/L, за испитивање се користи концентрација од 1 g/L. Супстанце чија је растворљивост у води мања од 1 mg/L не треба испитивати.

1.6.1. Метода плочице

Видети стандард SRPS H.E 8.047.

1.6.2. Метода узенгије

Видети стандард SRPS H.E 8.047.

1.6.3. Метода прстена

Видети стандард SRPS H.E 8.047.

1.6.4. Метода прстена хармонизована са OECD

1.6.4.1. Апарат

За ово мерење одговарајући су комерцијално доступни тензиометри. Они се састоје од следећих елемената:

– покретног стола за узорак;

– система за мерење силе;

– мерног тела (прстен);

– посуде за мерење.

1.6.4.1.1. Покретни сто за узорак

Покретни сто за узорак који се користи као носач температурно контролисане посуде за мерење у којој се налази течност која се испитује, поставља се на постоље заједно са системом за мерење силе.

1.6.4.1.2. Систем за мерење силе

Систем за мерење силе (видети Слику) налази се изнад стола за узорак. Грешка у мерењу силе не сме прелазити ± 10^{-6} N, што одговара грешци од ± 0,1 mg код мерења масе. У већини случајева, мерна скала комерцијално доступних тензиометара калибрисана је у mN/m тако да се површински напон директно очитава у mN /m са тачношћу од 0,1 mN/m.

1.6.4.1.3. Мерно тело (прстен)

Прстен је обично направљен од жице од платине и иридијума дебљине око 0,4 mm и средњег обима од 60 mm. Жичани прстен виси хоризонтално са металне игле и подупирача (конзоле) за постављање жице и ствара везу са системом за мерење силе (видети Слику).

Слика

1.6.4.1.4. Посуда за мерење

Посуда за мерење у којој се налази раствор који се испитује треба да буде од стакла са могућношћу контроле температуре. Посуда је тако направљена да за време мерења температура течности раствора који се испитује и гасне фазе изнад површине остаје константна тако да узорак не испари.

Прихватају се цилиндрични стаклени судови чији унутрашњи пречник није мањи од 45 mm.

1.6.4.2. Припрема апарата

1.6.4.2.1. Чишћење

Стаклени судови се пажљиво чисте. Уколико је неопходно, перу се врелом хром-сумпорном киселином, а након тога фосфорном киселином (83% до 98% масених H_3PO_4). Затим се стаклени судови детаљно испирају водом са чесме и на крају се испирају би-дестилованом водом до неутралне реакције, након чега се суше или испирају делом узорка течности за мерење.

Прстен се прво обилно испира водом да се уклоне све супстанце које су растворне у води. Прстен се затим кратко потопи у хром-сумпорну киселину, испере се би-дестилованом водом до неутралне реакције и на крају се кратко загреје изнад пламена метанола.

Напомена: Контаминација супстанцама које нису растворене или уништене хром-сумпорном или фосфорном киселином, као што су силикони, уклања се помоћу одговарајућег органског растварача.

1.6.4.2.2. Калибрација апарата

Валидација апарата састоји се од верификације и подешавања нулте тачке тако да показивач инструмента омогућава поуздано одређивање у mN/m.

Постављање: Апарат се нивелише постављањем нпр. либеле на базу тензиометра, уз подешавање завртњева којима се регулише ниво постоља.

Подешавање нулте тачке: Након постављања прстена на апарат пре потапања у течност, показивач тензиометра се подешава на нулу, а прстен се подешава паралелно са површином течности. У ту сврху, површина течности служи као огледало.

Калибрација: Калибрација се врши помоћу два поступка:

а) Коришћењем масе: процедура која користи јахаче познатих маса између 0,1 g и 1,0 g на прстену.

Фактор калибрације (Fa), са којим се сва очитавања множе, одређује се помоћу једначине[1]:

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

при чему је:

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

при чему:

m јесте маса јахача (допуне), изражена у g;

g јесте гравитационо убрзање (981 cm s^{-2} на нивоу мора);

b јесте средњи обим прстена, изражен у cm;

s_a јесте очитавање тензиометра наком постављања јахача на прстен, изражено у mN/m.

б) Коришћењем воде: поступак који користи чисту воду чији је површински напон на нпр. температури од 23° C једнак 72,3 mN/m. Овај поступак се обавља брже од калибрације масом, али увек постоји опасност да је површински напон воде лажан услед остатака контаминације сурфактантима.

Калибрациони фактор (F_b), са којим се множе сва очитавања са инструмента, одређује се помоћу једначине[2]:

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

при чему:

s_o јесте вредност из литературе за површински напон воде (mN/m);

s_g јесте измерена вредност површинског напона воде (mN/m), обе при истој температури.

1.6.4.3. Припрема узорака

Од супстанци које се испитују припремају се водени раствори у захтеваним концентрацијама. Не смеју садржати никакве нерастворне супстанце.

Раствор се одржава на константној температури (± 0,5° C). Пошто се површински напон раствора у мерном суду мења временом, врши се неколико мерења у различитим временским интервалима, при чему исцртана крива показује површински напон као функцију времена. Када промене престану да се дешавају, постиже се стање равнотеже.

Контаминација прашином и гасовима са других супстанци утиче на мерење. Због наведеног мерење се одвија испод заштитног поклопца.

1.6.5. Услови испитивања

Мерење се врши на температури од приближно 20° C и контролише се у оквиру ± 0,5° C.

1.6.6. Испитивање

Раствори који се мере преносе се у пажљиво опрану посуду за мерење, водећи рачуна да се избегне стварање пене, након чега се посуда за мерење поставља на сто апарата за испитивање. Врх табле са мерним судом се затим издиже све док прстен не зарони испод површине раствора који се мери. Након тога, врх табле се постепено и равномерно спушта (брзином од око 0,5 cm/min) да би се прстен одвојио од површине до постизања максималне силе. Течни слој који је залепљен на прстен не сме се одвајати од прстена. Након завршеног мерења, прстен се поново зарања испод површине, а мерење се понавља док се не постигне константна вредност површинског напона. За свако одређивање бележи се време од преношења раствора у мерни суд. Очитавање се врши при максималној сили потребној да се прстен одвоји од површине течности.

2. ПОДАЦИ

Ради израчунавања површинског напона, очитана вредност у mN/m на апарату се прво множи са фактором калибрације F_a или F_b (у зависности од тога који поступак калибрације је коришћен). Наведени поступак даје вредност која се примењује само приближно, те стога захтева корекцију.

Харкинс и Џордан[4] су емпиријски утврдили факторе корекције за вредности површинског напона измерене методом прстена, који зависе од: димензија прстена, густине течности и њеног површинског напона.

Из табела Харкинса и Џордана тешко је утврдити фактор корекције за свако индивидуално мерење, те се за прорачун површинског напона за водене растворе користи и поједностављена процедура очитавања корективних вредности површинског напона директно из табеле.

За очитавања која се налазе између табеларних вредности користи се интерполација.

Табела: Корекција измереног површинског напона

Само за водене растворе, r = 1 g/cm^3

r	9,55 mm (просечан полупречник прстена)
r	0,185 mm (полупречник жице прстена)

Експериментална вредност (mN/m)	Коригована вредност (mN/m)	
	Калибрација јахачем (видети одељак 1.6.4.2.2.а) ове методе)	Калибрација водом (видети одељак 1.6.4.2.2.б) ове методе)
20	16,9	18,1
22	18,7	20,1
24	20,6	22,1
26	22,4	24,1
28	24,3	26,1
30	26,2	28,1
32	28,1	30,1
34	29,9	32,1
36	31,8	34,1
38	33,7	36,1
40	35,6	38,2
42	37,6	40,3
44	39,5	42,3
46	41,4	44,4
48	43,4	46,5
50	45,3	48,6
52	47,3	50,7
54	49,3	52,8

Табела је израђена на основу Харкинс-Џорданове корекције[XXIII].

Алтернативно, без претходне калибрације, површински напон се израчунава према формули:

$$\sigma = \frac{fxF}{4\pi R}$$

при чему:

F јесте сила измерена динамометром у тачки прекида превлаке (филма);

R јесте полупречник прстена;

f јесте корективни фактор[1].

_____

XXIII Слична је табели која је дата у DIN стандарду (DIN 53914) за воду и водене растворе (густине r = 1 g/cm^3) и за комерцијално доступан прстен димензија R = 9,55 mm (средњи полупречник прстена) и r = 0,185 mm (полупречник жице прстена). Табела садржи кориговане вредности за мерења површинског напона након калибрације јахачем или водом.

3. ИЗВЕШТАЈ

3.1. ИЗВЕШТАЈ О ИСПИТИВАЊУ

Извештај о испитивању, уколико је могуће, садржи податке о:

– коришћеној методи;

– врсти воде или раствора који је коришћен;

– тачном опису супстанце (идентитет и нечистоће);

– резултатима мерења: површинског напона (очитавање) са наведеним појединачним очитавањима и њиховом аритметичком средњом вредношћу, као и са коригованом средњом вредношћу (узимајући у обзир фактор опреме и табелу корекције);

– концентрацији раствора;

– температури испитивања;

– старости коришћеног раствора; нарочито време између припреме и мерења раствора;

– опису временске зависности површинског напона након преноса раствора у мерни суд.

У извештају се наводе сви подаци и примедбе важне за тумачење резултата, нарочито подаци о нечистоћама и физичком стању супстанце.

3.2. ТУМАЧЕЊЕ РЕЗУЛТАТА

Имајући у виду да дестилована вода има површински напон 72,75 mN/m на температури од 20° C, супстанце које имају површински напон нижи од 60 mN/m у условима ове методе сматрају се површински активним.

4. ЛИТЕРАТУРА

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. РАСТВОРЉИВОСТ У ВОДИ

Део први

1. МЕТОДА ИСПИТИВАЊА

Ова метода заснива се на Упутству за испитивање OECD[1].

1.1. УВОД

Корисно је имати податке о: структурној формули, напону паре, константи дисоцијације и хидролизи (у функцији pH вредности) супстанце која се испитује.

Појединачне методе не могу обухватити цео опсег растворљивости у води.

Две методе испитивања покривају цео опсег растворљивости у води, али се не могу применити на испарљиве супстанце:

– једна метода се примењује на чисте супстанце које имају малу растворљивост (< 10^{-2} g/L) и које су стабилне у води, а назива се: „Метода елуирања са колоне”;

– друга метода се односи на чисте супстанце са већом растворљивошћу (> 10^{-2} g/L) и које су стабилне у води, а назива се: „Метода стакленог суда”.

Присуство нечистоћа може значајно утицати на растворљивост испитиване супстанце у води.

1.2. ДЕФИНИЦИЈЕ И МЕРНЕ ЈЕДИНИЦЕ

Растворљивост супстанце у води одређена је масеном концентрацијом супстанце у засићеном воденом раствору на одређеној температури.

Растворљивост у води изражава се јединицама масе по запремини раствора. Мерна јединица у Међународном систему јединица (SI) система је kg/m^3 (могу се користити и g/L).

1.3. РЕФЕРЕНТНЕ СУПСТАНЦЕ

Референтне супстанце се не користе сваки пут када се испитује нова супстанца. Оне првенствено служе за повремену проверу методе и да омогуће поређење са резултатима добијеним другим методама.

1.4. ПРИНЦИП МЕТОДЕ

Прелиминарним испитивањима се утврђује приближна количина узорка и време неопходно да се постигне концентрација засићеног раствора.

1.4.1. Метода елуирања са колоне

Ова метода заснива се на елуирању испитиване супстанце водом из микроколоне која је напуњена инертним материјалом, као што су грануле стакла или песак, који је прекривен супстанцом која се испитује. Растворљивост у води одређује се када масена концентрација елуата постане константна. Резултати се наводе као плато концентрације у функцији времена.

1.4.2. Метода стакленог суда

Код овог поступка супстанца (чврсте супстанце треба да буду спрашене) се раствара у води на температури нешто вишој од температуре испитивања. Када дође до засићења, смеша се хлади и оставља да стоји на температури на којој се врши испитивање, уз мешање док се не постигне равнотежа. Мерење се врши и директно на температури на којој се испитује, уколико се одговарајућим узорковањем потврди да је постигнуто равнотежно засићење. Након тога, применом одговарајуће аналитичке методе, утврђује се масена концентрација супстанце у воденом раствору који не сме садржавати нерастворне честице.

1.5. КРИТЕРИЈУМИ КВАЛИТЕТА

1.5.1. Поновљивост

Код методе елуирања са колоне може се добити резултат < 30%, а код методе стакленог суда очекивани резултат је < 15%.

1.5.2. Осетљивост

Осетљивост зависи од методе анализе, али могуће је одредити масене концентрације до 10^{-6} g/L.

1.6. ОПИС МЕТОДЕ

1.6.1. Услови испитивања

Испитивање се најчешће спроводи на температури од 20° C ± 0,5° C. Уколико се посумња да растворљивост зависи од температуре (> 3% по° C), растворљивост се испитује на још две температуре које су најмање за 10° C ниже или више од почетне температуре. У том случају контрола температуре треба да буде у опсегу ± 0,1° C. Изабрана температура треба да буде константна у свим важним деловима опреме.

1.6.2. Прелиминарна испитивања

Приближно 0,1 g узорка (чврсте супстанце треба да буду спрашене) пренесе се у градуисану мензуру са стакленим запушачем (запремине 10 mL) и додају се постепено повећане запремине дестиловане воде на собној температури у корацима датим у табели:

0,1 g растворен у „x” mL воде	0,1	0,5	1	2	10	100	> 100
Приближно утврђена растворљивост (g/L)	> 1000	1000 до 200	200 до 1000	100 до 50	50 до 10	10 до 1	< 1

Након сваког додавања наведене количине воде, смеша се снажно мућка 10 минута и визуелно се проверава да ли има нерастворних делова узорка. Уколико након додавања 10 mL воде узорак или неки његови делови остају нерастворени, експеримент се понавља у мензури запремине 100 mL са већим запреминама воде. Код супстанци које су слабо растворне у води време које је неопходно да би се растворила супстанца може бити знатно дуже (најмање 24 сата). Приближна вредност растворљивости из Табеле односи се на запремину воде која је нешто мало испод оне вредности при којој долази до потпуног растварања супстанце. Уколико је очигледно да се супстанца није до краја растворила, оставља се да се раствара дуже од 24 сата (максимум 96 сати) или се врше даља разблаживања како би се потврдило да ли је за коришћење погоднија метода елуирања са колоне или метода стакленог суда.

1.6.3. Метода елуирања са колоне

1.6.3.1. Носач, растварач и елуент

Носач који се користи код методе елуирања са колоне треба да буде инертан. Материјали који се могу користити су стаклене куглице и песак. За наношење узорка на носач користе се испарљиви растварачи аналитичке чистоће. За елуирање се користи би-дестилована вода која је дестилована у стакленој или кварцној апаратури.

Напомена: Деминерализована вода која долази са органског јоноизмењивача не сме се користити.

1.6.3.2. Наношење супстанце на носач

Око 600 mg носача измери се и унесе у балон са округлим дном запремине 50 mL. Одговарајућа, прецизно измерена количина супстанце која се испитује раствори се у изабраном растварачу. Одговарајућа количина овог раствора додаје се на носач. Растварач се у потпуности упари нпр. употребом ротационог вакуум упаривача. У супротном, не постиже се оптимална влажност подлоге због ефекта расподеле на површини носача.

Пуњење носача производи проблеме (нетачне резултате) уколико се супстанца која се испитује депонује у облику уља

или у различитој кристалној фази. Овај проблем се испитује кроз експерименте и сачињава се детаљан извештај о томе.

Носач се остави да се натапа око два сата у 5 mL воде, а потом се суспензија преноси у микроколону. Алтернативно, у микроколону која је напуњена водом сипа се осушени носач који се остави у колони око два сата да се уравнотежи.

Поступак испитивања:

Елуирање супстанце са носача изводи се:

– помоћу рециркулационе пумпе (видети Слику 1) или

– помоћу суда за нивелисање (видети Слику 4).

1.6.3.3. Метода елуирања са колоне помоћу рециркулационе пумпе

Апаратура

Шематски приказ опреме дат је на Слици 1. Одговарајућа микроколона приказана је на Слици 2, иако је прихватљива било која величина која испуњава критеријуме који се односе не репродуктивност и осетљивост. Колона треба да има довољно места за најмање пет запремина воде и да може да издржи пет узорака. Величина колоне се може смањити уколико се користи припремљени раствор који замењује пет запремина које се користе за уклањање нечистоћа.

Колона се повезује са рециркулационом пумпом са контролисаним протоком око 25 mL/h. Пумпа се повезује помоћу политетрафлуоретиленских (у даљем тексту: ПТФЕ) и/или стаклених конектора. Колона и пумпа, када се саставе, треба да имају могућност узорковања ефлуента и изједначавања притиска. Материјал у колони задржава мали чеп (5 mm) од стаклене вуне који служи и као филтер за честице нечистоћа. Пумпа је перисталтичка пумпа или мембранска пума (води се рачуна да не дође да загађења и/или апсорпције материјала из цеви).

Мерење

Почети проток кроз колону. Препоручује се да се користи проток од око 25 mL/h (то одговара 10 запремина/h за колону која је описана). Првих пет запремина (минимум) одбацити како би се са њима издвојиле нечистоће растворне у води. Након тога пумпа се оставља да ради све док се не постигне равнотежа. Сматра се да је успостављена равнотежа када се у пет насумично узетих узастопних узорака концентрације не разликују за више од ± 30%. Ови узорци се раздвајају једни од других по временским интервалима који одговарају проласку најмање 10 запремина елуента.

1.6.3.4. Метода елуирања са колоне помоћу суда за нивелисање

Апаратура (видети Слике 4 и 3)

Суд за нивелисање: Спајање са судом за нивелисање врши се употребом шлифованог споја који је повезан помоћу цеви од ПТФЕ. Препоручује се да се користи проток од око 25 mLl/h. Прикупљене фракције анализирају се изабраном методом.

Мерење

Фракције које припадају средњем опсегу елуције, када су концентрације константне (± 30%) у најмање пет узастопних фракција, користе се да би се одредила растворљивост у води.

У оба случаја (када се користи пумпа или посуда за нивелисање) се испитује растворљивост са упола мањим протоком у односу на прво испитивање. Уколико се резултати два испитивања слажу, резултат је задовољавајући. Уколико је растворљивост очигледно већа при мањем протоку, наставља се преполовљавање брзине протока све док два сукцесивна испитивања не дају приближне резултате.

У оба случаја (када се користи пумпа или посуда за нивелисање) фракције се проверавају на садржај колоидних честица Тиндаловим ефектом (распршавањем снопа светлости). Присуство колоидних честица мења резултате и испитивање се понавља уз побољшано филтрирање кроз колону.

Потребно је измерити pH вредност сваког узорка. Испитивање при мањем протоку изводи се при истој температури.

1.6.4. Метода стакленог суда

1.6.4.1. Опрема

За примену методе стакленог суда потребно је:

– уобичајено лабораторијско посуђе од стакла и инструменти;

– уређај погодан за мешање раствора при контролисаним константним температурама;

– центрифуга (пожељно термостатирана), уколико се ради са емулзијама;

– опрема за аналитичко одређивање.

1.6.4.2. Мерење

Количина потребног материјала да би се постигло засићење жељене запремине воде утврђује се на основу прелиминарног испитивања. Запремина воде која је неопходна зависи од примењене аналитичке методе и опсега растворљивости. Количина материјала (око пет пута већа од оне која је утврђена прелиминарним испитивањем) одмери се и стави у сваку од три стаклене посуде које имају стаклене запушаче (нпр. епрувете или кивете за центрифугирање, балони). Одређена количина воде додаје се у сваку посуду и оне се чврсто затворе. Затворене посуде потом се мешају на температури од 30° C. (Користи се уређај који меша при константној температури, нпр. магнетно мешање у термостатираном воденом купатилу). Након једног дана, једна од посуда се уклања и остави се, уз повремено мешање, на температури на којој се изводи испитивање током 24 сата да би се успоставила равнотежа. Садржај посуде се затим центрифугира на температури на којој се врши испитивање и одређује се концентрација супстанце у воденој фази употребом одговарајуће аналитичке методе. Преостале две посуде пролазе кроз исти поступак након почетног уједначавања при температури од 30° C у року од два односно три дана. Уколико се концентрације из најмање две посуде слажу са жељеном поновљивошћу, сматра се да је испитивање задовољило критеријуме. Испитивање се понавља, уз дуже време успостављања равнотеже, уколико резултати из посуда 1, 2 и 3 показују тенденцију повећања вредности.

Мерење се врши без периода инкубације на температури од 30° C. Да би се одредила брзина успостављање равнотеже засићења, узорци се узимају до тренутка када време мешања више не утиче на концентрацију испитиваног раствора.

Потребно је забележити pH вредност сваког узорка.

1.6.5. Анализа

При овим одређивањима за сваку одређену супстанцу потребно је применити аналитичку методу која је за њу одговарајућа, с обзиром да мале количине растворених нечистоћа могу довести до великих грешака у одређивању растворљивости. Методе које се примењују могу бити: гасна или течна хроматографија, методе титрације, фотометријске методе, волтаметријске методе.

2. ПОДАЦИ

2.1. МЕТОДА ЕЛУИРАЊА СА КОЛОНЕ

Потребно је израчунати средњу вредност за најмање пет узастопних узорака узетих из посуде у којој се налазе засићени раствори, као и вредност стандардне девијације. Резултати се приказују у јединицама масе по запремини раствора.

Средње вредности израчунате за два испитивања у којима се користе различите брзине протока се упоређују и треба да имају поновљивост мању од 30%.

2.2. МЕТОДА СТАКЛЕНОГ СУДА

Приказују се појединачни резултати за сваку од посуда и уколико су ови резултати константни (поновљивост мања од 15%), треба израчунати њихову средњу вредност и изразити је у јединицама маса по запремини раствора. Ово захтева претварање масених јединица у запреминске јединице, коришћењем густине када је растворљивост веома велика (> 100 g/L).

3. ИЗВЕШТАЈ

3.1. МЕТОДА ЕЛУИРАЊА СА КОЛОНЕ

Извештај о испитивању, уколико је могуће, садржи податке о:

– резултатима прелиминарних испитивања;

– прецизном опису супстанце (идентитет и нечистоће);

– појединачним концентрацијама, брзини протока и pH вредности за сваки узорак;

– средњој вредности и стандардној девијацији најмање пет узорака из подручја засићења за свако испитивање;

– просечној вредности два узастопна, прихватљива испитивања;

– температури воде при прављењу засићеног раствора;

– коришћеној методи анализе;

– материјалу носача;

– начину наношења узорка на носач;

– коришћеном растварачу;

– евиденцији, ако је дошло до хемијске нестабилности супстанце за време испитивања и коришћеној методи.

У извештају се наводе сви подаци и примедбе важне за тумачење резултата, нарочито подаци о нечистоћама и физичком стању супстанце.

3.2. МЕТОДА СТАКЛЕНОГ СУДА

Извештај о испитивању, уколико је могуће, садржи податке о:

– резултатима прелиминарног испитивања;

– прецизном опису супстанце (идентитет и нечистоће);

– појединачним аналитичким одређивањима и средњој вредности када је одређено више од једне вредности за сваку посуду;

– pH вредности сваког узорка;

– температури на којој је вршено испитивање;

– просечној вредности резултата од различитих посуда, а који су у сагласности;

– коришћеној аналитичкој методи;

– евиденцији, ако је дошло до хемијске нестабилности супстанце за време испитивања и коришћеној методи.

У извештају се наводе сви подаци и примедбе важне за тумачење резултата, нарочито подаци о нечистоћама и физичком стању супстанце.

4. ЛИТЕРАТУРА

1. OECD, Paris, 1981, Test Guideline 105, Decision of the Council C(81) 30 final.

2. NF T 20-045 (AFNOR) (September 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) (September 85) Chemical products for industrial use – Determination of water solubility of solids and liquids with high solubility – Flask method.

Део други

Слика 1: Метода елуирања са колоне помоћу рециркулационе пумпе

Слика 2: Типична микроколона (све димензије дате су у милиметрима)

Слика 3: Типична микроколона (све димензије дате су у милиметрима)

Слика 4: Метода елуирања са колоне помоћу суда за нивелисање

При чему је:
1. Посуда за нивелацију (нпр. боца запремине 2,5 L);
2. Колона (видети Слику 3);
3. Колектор фракција;
4. Термостат;
5. Тефлонска цев;
6. Шлифовани спој;
7. Цев за воду (између термостата и колоне, унутрашњег пречника: приближно 8 mm).

А.8. КОЕФИЦИЈЕНТ РАСПОДЕЛЕ

Део први

1. МЕТОДА ИСПИТИВАЊА

Метода мућкања у стакленом балону заснива се на Упутству за испитивање OECD[1].

1.1. УВОД

Корисно је имати прелиминарне податке о: структурној формули, константи дисоцијације, растворљивости у води, хидролизи, растворљивости у *n*-октанолу и површинском напону супстанце која се испитује.

Код супстанци које јонизују испитивања се спроводе на њиховим нејонизованим облицима (слободне киселине или слободне базе) што се постиже употребом одговарајућег пуфера чија је pH вредност најмање за једну јединицу испод (слободне киселине) или изнад (слободне базе) pK.

Ова метода испитивања обухвата две различите методе: методу мућкања у стакленом балону и високо ефикасну течну хроматографију (High performance liquid chromatography, у даљем тексту: HPLC). Метода мућкања у стакленом балону користи се када се вредност log P_{ow} (видети објашњење дато у овој методи) налази у опсегу од – 2 до 4. Матода течне хроматографије користи се када се вредност log P_{ow} налази у опсегу од 0 до 6. Пре него што се приступи спровођењу било које од ове две методе потребно је одредити прелиминарне процене коефицијента расподеле.

Метода мућкања у стакленом балону примењује се само за чисте супстанце растворне у води и *n*-октанолу. Метода се не примењује за површински активне супстанце (за њих се даје израчунати или процењени коефицијент расподеле који се заснива на растворљивости у води и у *n*-октанолу).

Метода течне хроматографије (у даљем тексту: HPLC метода) не примењује се на јаке киселине и базе, комплексе метала, површински активне супстанце и супстанце које реагују са елуентом. За ове супстанце се израчунава или процењује коефицијент расподеле који се заснива на растворљивости у води и у *n*-октанолу.

Метода течне хроматографије мање је осетљива на присутне нечистоће у испитиваном једињењу у односу на поступак мућкања у стакленом балону. Понекад присуство нечистоћа утиче на тумачење резултата јер положај пикова постаје несигуран. Код смеша код којих се не раздвајају траке у хроматограму, наводи се горњи и доњи лимит log P.

1.2. ДЕФИНИЦИЈЕ И МЕРНЕ ЈЕДИНИЦЕ

Коефицијент расподеле (P) јесте однос равнотежних концентрација (c_i) растворене супстанце у двофазном систему који се састоји од два растварача који се не мешају. У случају *n*-октанола и воде:

$$P_{ow} = \frac{c_{n-\text{октанол}}}{c_{\text{вода}}}$$

Коефицијент расподеле (P) јесте количник две концентрације, који се уобичајено изражава у виду логаритамске вредности са основом 10 (log P).

1.3. РЕФЕРЕНТНЕ СУПСТАНЦЕ

1.3.1. Метода мућкања у стакленом балону

Референтне супстанце се не користе сваки пут када се испитује нова супстанца. Оне првенствено служе за повремену проверу методе и да омогуће поређење са резултатима добијеним другим методама.

1.3.2. Метода течне хроматографије

Да би се успоставила корелација између измерених HPLC вредности супстанце и њихових P вредности, конструише се калибрациона крива зависности log P од хроматографских података са најмање 6 референтних тачака. Корисник бира одговарајућу референтну супстанцу. Ако је могуће, најмање једна референтна супстанца има P_{ow} већи од P_{ow} супстанце која се испитује и једна референтна супстанца има P_{ow} мањи од супстанце која се испитује. За вредности log P мање од 4 калибрација се заснива на подацима добијеним применом методе мућкања у стакленом балону. За вредности log P веће од 4 калибрација се заснива на валидираним вредностима датим у литератури уколико се оне подударају са израчунатим вредностима. За постизање боље прецизности, најбоље је као референтне супстанце узети оне супстанце које су сличне структуре као супстанца која се испитује.

Вредности log P_{ow} доступне су за многа хемијска једињења[2, 3]. Уколико не постоје подаци о коефицијенту расподеле за структурно сличне супстанце, прави се општија калибрациона крива на основу података о другим референтним супстанцама.

Списак препоручених референтних супстанци и њихових log P_{ow} вредности дат је у Делу другом ове методе.

1.4. ПРИНЦИП МЕТОДЕ

1.4.1. Метода мућкања у стакленом балону

Да би се одредио коефицијент расподеле, треба постићи равнотежу између свих компоненти система и одредити концентрације растворене супстанце у обе фазе. Литература упућује да се у те сврхе користи неколико различитих техника, нпр. мешање две фазе које се потом раздвајају како би се утврдиле равнотежне концентрације испитиване супстанце.

1.4.2. Метода течне хроматографије

HPLC се изводи на аналитичким колонама пакованим са комерцијално доступном чврстом фазом која садржи дуге ланце угљоводоника (нпр. C_8, C_{18}) који су хемијски везани на силицијум диоксид. Хемикалије нанете на такве колоне крећу се кроз њих различитим брзинама због различите расподеле између мобилне фазе и угљоводоничне стационарне фазе. Смеше хемикалија раздвајају се према њиховој хидрофобности, при чему се хемијска једињења која су растворна у води издвајају прва, а последња се издвајају она која се растварају у уљима, пропорционално њиховом коефицијенту расподеле угљоводоник – вода. Ово омогућава да се установи веза између ретенционог времена на таквој колони (реверсно-фазној) и коефицијента расподеле за систем *n*-октанол/вода. Коефицијент расподеле се изводи из фактора капацитета k, који је дат у једначини:

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

при чему:

t_r јесте ретенционо време супстанце која се испитује;

t_o јесте просечно време које је потребно молекулу растварача да прође кроз колону (мртво време).

Није потребна примена квантитативних аналитичких метода. Потребно је одредити време елуције.

1.5. КРИТЕРИЈУМИ КВАЛИТЕТА

1.5.1. Поновљивост

Метода мућкања у стакленом балону

У циљу обезбеђивања тачности партиционог коефицијента, неопходно је вршити по два одређивања на три различита

услова испитивања при чему количина супстанце као и однос између запремина растварача може да варира. Утврђене вредности партиционих коефицијената изражене у логаритмима треба да буду у оквиру ± 0,3 јединице.

HPLC метода

У циљу обезбеђивања поверења у резултате мерења врше се два испитивања. Вредности log P изведене из појединачних мерења налазе се у опсегу од ± 0,1 јединице log P.

1.5.2. Осетљивост

Метода мућкања у стакленом балону

Опсег мерења ове методе одређује детекциони лимит аналитичког поступка. Детекциони лимит омогућава одређивање вредности log P_{ow} у опсегу од – 2 до 4 (када постоје услови, опсег се може проширити на вредности log P_{ow} до 5) када концентрација растворене супстанце у било ком од растварача није већа од 0,01 mol/L.

HPLC метода

HPLC метода омогућава одређивање коефицијента расподеле у опсегу log P_{ow} од 0 до 6.

Коефицијент расподеле једињења у нормалним околностима утврђује се уз варијацију од ± 1 log P_{ow} јединице вредности добијене мућкањем у стакленом балону. Начини за успостављање корелације између ових вредности могу се наћи у литератури[4, 5, 6, 7, 8]. Већа тачност постиже се када се корелација врши преко структурно сличних референтних једињења[9].

1.5.3. Специфичности

Метода мућкања у стакленом балону

Нернстов закон расподеле примењује се само при константној температури, притиску и pH вредности за разблажене растворе. Примењује се само на чисте супстанце расподељене између два чиста растварача. Присуство више различитих растворених супстанци у једном или оба растварача у исто време утиче на резултате.

Дисоцијација или асоцијација растворених молекула доводи до одступања од Нернстовог закона расподеле. На ова одступања указује појава зависности коефицијента расподеле од концентрације раствора.

Због постојања већег број равнотежа, ова метода се не примењује без претходне корекције на супстанце које јонизују. Код оваквих једињења разматра се употреба пуфера уместо воде. pH вредност пуфера треба да се разликује најмање за једну pH јединицу од pKa супстанце и води се рачуна о утицају те pH вредности на животну средину.

1.6. ОПИС МЕТОДЕ

1.6.1. Прелиминарна процена коефицијента расподеле

Коефицијент расподеле се најбоље процењује применом рачунске методе (видети Део други ове методе) или, када је могуће, из односа растворљивости испитиване супстанце у чистим растварачима[10].

1.6.2. Метода мућкања у стакленом балону

1.6.2.1. Припрема

n-октанол: За одређивање коефицијента расподеле користе се растварачи високе чистоће (аналитичке чистоће).

Вода: Користи се дестилована или бидестилована вода која је дестилована у стакленој или кварцној апаратури. За једињења које јонизују користе се пуферски раствори уместо воде уколико је оправдано.

Напомена: Не користи се вода која је пречишћена на јоноизмењивачу.

1.6.2.1.1. Предзасићење растварача

Пре него што се приступи одређивању партиционог коефицијента, растварачи се засићују узајамно, мућкањем на температури на којој се изводи експеримент. Ово је најбоље урадити тако што се у две велике боце у којима се чувају аналитички *n*-октанол високе чистоће или вода дода довољна количина оног другог растварача и мућка у механичком шејкеру 24 сата, након чега одстоје све док се два растварача не раздвоје и не достигне засићење.

1.6.2.1.2. Припрема за испитивање

Укупна количина два растварача треба да скоро напуни суд. Овако се спречава губитак испитиваног једињења услед испаравања. Однос запремине и количине супстанце која се испитује одређен је:

– прелиминарном проценом коефицијента расподеле (видети дато објашњење);

– минималном количином супстанце која се испитује неопходном за аналитички поступак и

– ограничењима која се односе на максималну концентрацију у оба растварача од 0,01 мола по литру.

Спроводе се три испитивања. У првом испитивању користи се израчунат однос запремине *n*-октанола према води. У другом испитивању овај однос се дели са два. У трећем испитивању овај однос множи се са два (нпр. 1:1, 1:2, 2:1).

1.6.2.1.3. Испитивана супстанца

Основни раствор се припрема у *n*-октанолу засићеном водом. Концентрација основног раствора прецизно се утврђује пре него што се приступи одређивању коефицијента расподеле. Раствор се чува у условима који омогућавају да буде стабилан.

1.6.2.2. Услови испитивања

Температура испитивања треба да буде константна (± 1° C) у распону од 20° C до 25° C.

1.6.2.3. Мерење

1.6.2.3.1. Успостављање равнотеже расподеле

По две посуде које садрже жељене, прецизно измерене количине два растварача заједно са неопходном количином основног раствора спремају се за сваки услов испитивања.

Фаза *n*-октанола мери се запремински. Посуде за испитивање смештају се у прикладну мућкалицу (шејкер) или се ручно измућкају. Када се користе кивете за центрифугирање препоручени начин руковања јесте да се цев ротира брзо за 180° око трансверзалне осе тако да ваздух који је ушао прође кроз обе фазе. Искуство је показало да је 50 таквих ротација довољно да се успостави равнотежа расподеле. Препоручује се 100 ротација у року од 5 минута.

1.6.2.4. Одвајање фаза

Ако је неопходно, да би се раздвојиле фазе, смеша се центрифугира. Двофазни систем се центрифугира на лабораторијској центрифуги, на собној температури или, ако се користи центрифуга без регулације температуре, кивете се држе на температури која одговара оној у којој се спроводи читаво испитивање најмање 1 сат пре испитивања.

1.6.2.5. Анализа

Да би се одредио партициони коефицијент неопходно је одредити концентрације испитиване сусптанце у обе фазе. Ово се ради узимањем аликвота из сваке од две фазе из сваког испитивања и анализирањем ових узорака. Укупна количина супстанце присутна у обе фазе израчунава се и упоређује са количином супстанце која је унета на почетку теста.

Водена фаза се узоркује поступком који смањује ризик од узорковања и трагова *n*-октанола. Користи се стаклени шприц са иглом за једнократну употребу за узорковање водене фазе. Шприц се претходно делимично напуни ваздухом. Ваздух се полако истискује док игла пролази кроз слој *n*-октанола. Затим се одређена количина водене фазе усиса у шприц. Шприц се брзим покретом извуче из раствора, а игла одстрани. Садржај напуњеног шприца се тада користи као узорак водене фазе. Концентрација у две различите фазе утврђује се коришћењем метода које су одговарајуће за сваку од супстанци. Неке од одговарајућих метода су:

– фотометријске методе;

– гасна хроматографија;

– HPLC метода.

1.6.3. HPLC метода

1.6.3.1. Припрема

Опрема

Течни хроматограф са пумпом без пулса и одговарајући детектор чине неопходну опрему. Препоручује се коришћење инјектора са петљом. Присуство поларних група у стационарној фази може озбиљно да наруши прецизност колоне за течну хроматографију. У стационарној фази је присутан минимални проценат поларних група[11]. Користе се комерцијална микрочестична реверсно-фазна паковања или претходно припремљене колоне. Између ињектора и колоне поставља се предколона.

Мобилна фаза

За припрему елуента користе се метанол HPLC чистоће и вода HPLC чистоће који се дегазирају пре употребе. Користи се изократска елуција. Препоручује се однос метанол/вода са минималним садржајем воде у износу од 25%. Типична смеша метанола и воде у односу 3:1 (v/v) користи се за елуирање једињења са logP 6 у року од једног сата, са протоком од 1 ml/min. За једињења са високим logP некада је потребно скратити време елуирања (као и за референтне супстанце) смањивањем поларности мобилне фазе или дужине колоне.

Супстанце које су слабо растворне у *n*-октанолу имају тенденцију да дају ниске log P_{ow} вредности при одређивању HPLC методом, пиковима таквих смеша је понекад придружен фронт растварача. Ово се објашњава чињеницом да је процес

расподеле превише спор да би се достигла равнотежа у времену које је обично неопходно за HPLC раздвајање. Смањење брзине протока и/или снижавање односа метанол/вода могу помоћи да се у тим случајевима добију поузданије вредности.

Супстанца која се испитује и референтна супстанца треба да буду растворне у мобилној фази у довољној концентрацији да могу да се детектују. Изузетно се могу користити адитиви код смеше метанол-вода, пошто адитиви мењају својства колоне. Код хроматограма који садрже адитиве обавезно је користити засебне колоне истог типа. Уколико смеша метанол-вода није одговарајућа, користи се нека друга смеша органског растварача и воде, нпр етанол и вода или ацетонитрил и вода.

Вредност pH елуента је критична код једињења која јонизују. Ова вредност треба да се креће у оквиру радне pH вредности колоне, која обично износи између 2 и 8. Препоручује се примена пуфера. Води се рачуна да не дође до преципитације соли на колони и њеног уништавања, што се догађа код појединих смеша органска фаза/пуфер. HPLC мерења са стационарном фазом која је на бази силицијум-диоксида на pH вредностима изнад 8 не препоручују се пошто алкалне мобилне фазе оштећују колону и умањују перформансе колоне.

Растворене супстанце

Референтне супстанце треба да буду што је могуће чистије. Једињења које се користе у испитивању или за калибрацију треба да буду растворна у мобилној фази, ако је могуће.

Услови испитивања

Температура током испитивања не треба да варира за више од ± 2K.

1.6.3.2. Мерење

Израчунавање мртвог времена t_o

Мртво време се одређује коришћењем серије хомолога (нпр *n*-алкил метил кетони) или органских једињења која се не задржавају на колони (нпр. тиокарбамид или формамид). Да би се израчунало мртво време уз помоћ хомологих серија, сет од најмање седам чланова хомологе серије се ињектује и мере се ретенциона времена. Ретенциона времена $t_{r(nc+1)}$ уцртавају се на графику као функција од $t_{r(n\,c)}$ и одређују се одсечак a и нагиб b у једначини:

$$t_{r(n\,c+1)} = a + b\,t_{r(n\,c)}$$

при чему:

n_c јесте број атома угљеника.

Мртво време се израчунава једначином:

$$t_o = a/(1 - b)$$

Калибрациона крива

Следећи корак је да се направи корелација између log k вредности према log P вредностима за одговарајуће референтне супстанце. У пракси, сет од између 5 и 10 стандрадних референтних супстанци чија logP вредност је у очекиваном опсегу ињектује се симултано и одређују се њихова ретенциона времена, по могућности преко интегратора који је повезан са системом за детекцију. Одговарајуће логаритамске вредности фактора капацитета (log k) рачунају се и уцртавају као функције log P који је утврђен применом поступка мућкања у стакленом балону. Калибрација се обавља у правилним интервалима, најмање једном дневно, тако се компензују измене у перформансама колона.

Утврђивање фактора капацитета испитиване сусптанце

Супстанца која се испитује ињектује се у најмањој могућој количини мобилне фазе. Одређује се ретенционо време (по два одређивања), што омогућава израчунавање фактора капацитета (к). Са калибрационе криве референтних супстанци интерполира се коефицијент расподеле испитиване супстанце. Код веома ниских и веома високих вредности коефицијената расподеле, неопходна је екстраполација. Води се рачуна о границама поузданости регресионе криве.

2. ПОДАЦИ

Метода мућкања у стакленом балону

Поузданост утврђених вредности за P испитује се поређењем средњих вредности из оба испитивања са укупном средњом вредношћу.

3. ИЗВЕШТАЈ

Извештај о испитивању садржи податке о:

– прецизном опису супстанце (идентитет и нечистоће);

– када се методе не могу применити (нпр. површински активне супстанце), обезбеђује се рачунским путем изведена или процењена вредност на основу растворљивости у *n*-октанолу и води;

– све податке и примедбе важне за тумачење резултата, нарочито подаци о нечистоћама и физичком стању супстанце.

Извештај о испитивању код поступка мућкања у стакленом балону садржи:

– резултате прелиминарних испитивања, ако постоје;

– температуру на којој је вршено одређивање;

– податке о аналитичким поступцима којима су одређиване концентрације;

– време и брзину центрифугирања, ако је вршено;

– измерене концентрације у обе фазе код сваког одређивања (укупно 12 концентрација);

– масу испитиване супстанце, запремину сваке фазе у свакој посуди и укупне израчунате количине испитиване супстанце присутне у свакој фази након успостављања равнотеже;

– израчунате вредности партиционог коефицијента (P) и средње вредности за сваки сет услова испитивања као и средњу вредност за сва одређивања. Уколико се сматра да постоји зависност коефицијента расподеле од концентрације то се наводи у извештају;

– стандардне девијације индивидуалних P вредности од средње вредности;

– средњу вредност P од свих одређивања, изражава се у виду логаритма (основе 10);

– израчунату теоријску вредност P_{ow} ако је утврђена или када је измерена вредност > 10^4;

– pH вредност коришћене воде и водене фазе током експеримента;

– уколико се користе пуфери, наводе се разлози за њихову примену уместо воде, њихов састав, концентрација и pH вредност, pH водене фазе пре и после експеримента.

Извештај о испитивању за HPLC методу садржи:

– резултате претходних испитивања, ако постоје;

– испитивану супстанцу и референтне супстанце, и степен њихове чистоће;

– температурни опсег при испитивању;

– pH вредности на којој је одређиван коефицијент расподеле;

– детаље о аналитичкој колони, предколони, мобилној фази и начинима детекције;

– податке о ретенционим временима и литературним вредностима log P референтних супстанци коришћених за калибрацију;

– детаље о регресионој кривој (log k према log P);

– просечна ретенциона времена и интерполиране вредности log P за испитивано једињење;

– опис опреме и услова испитивања;

– елуциони профил;

– количине испитиваних и референтних супстанци које су унете у колону;

– мртво време и начин на који је измерено.

4. ЛИТЕРАТУРА

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 -Nygärd, Chemosphere, 1980, vol. 80, 683.

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

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

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

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

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

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

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

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

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 Coefficients - Flask shakin g method.

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

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

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

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

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

20. J.K. Seydel and K.J. Schaper, Chemische St ruktur 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. 19,615.

Део други
МЕТОДЕ ИЗРАЧУНАВАЊА/ПРОЦЕНЕ

УВОД

Општи увод за методе израчунања, подаци и примери могу се наћи у литератури[1].

Израчунате вредности P_{ow} могу се користити у следеће сврхе:

– да се изабере одговарајућа експериментална метода (опсег за методу мућкања у стакленом балону: log P_{ow}: – 2 до 4, опсег за HPLC методу: log P_{ow} од 0 до 6);

– за избор одговарајућих услова испитивања (нпр. референтне супстанце за HPLC поступак, однос запремина *n*-октанол/вода код поступка мућкања у стакленом балону);

– као интерна лабораторијска провера могућих експерименталних грешака;

– да се обезбеде процењене вредности за P_{ow} у случајевима када се не могу применити експерименталне методе из техничких разлога.

МЕТОДА ПРОЦЕНЕ

Прелиминарна процена партиционог коефицијента

Вредност партиционог коефицијента процењује се на основу растворљивости испитиване супстанце у чистим растварачима:

$$P_{процењено} = \frac{\text{засићење } c_{\text{н-октанол}}}{\text{засићење } c_{\text{вода}}}$$

МЕТОДЕ ИЗРАЧУНАВАЊА

Принцип метода израчунавања

Све методе израчунавања заснивају се на фрагментацији молекула на одговарајуће мање структуре за које је познат

допринос вредности P_{ow}. Вредност log P_{ow} која се односи на читав молекул израчунава се потом као збир одговарајућих вредности фрагмената плус збир корекција због интрамолекулских интеракција.

Постоје спискови константи фрагмената и корекционих чланова[2, 3, 4, 5]. Неке од ових вредности редовно се ажурирају[2].

Критеријуми квалитета

Поузданост методе израчунавања опада са повећањем сложености једињења. Код једноставних молекула са малим молекулским масама и једном или две функционалне групе, очекује се одступање од 0,1 до 0,3 јединица вредности log P_{ow} између резултата различитих метода фрагментације и измерене вредности. У случају сложенијих молекула граница грешке је и већа. Граница грешке зависи од поузданости и доступности вредности константи које се односе на одређене фрагменте, као и од способности да се препознају интрамолекулске интеракције (нпр. водоничне везе) и од правилне употребе корекција (проблем је мањи ако се користи компјутерски софтвер CLOGP-3)[2]. Код једињења која јонизују важно је исправно тумачење наелектрисања и степена јонизације.

Поступак израчунавања

Ханшова п – метода

Оригинална константа п хидрофобног супституента коју је увео Фујира са групом аутора[6] дефинише се на следећи начин:

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

при чему:

P_{ow} (PhX) јесте партициони коефицијент супституисаног ароматичног деривата;

P_{ow} (PhH) јесте коефицијент несупституисаног једињења.

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

У складу са дефиницијом ова метода се пре свега примењује код ароматичних супституената. п вредности за велики број оваквих супституената дате су у табели[2, 3, 4]. Ове вредности се користе за израчунавање log P_{ow} за ароматичне молекуле или фрагмената.

Рекерова метода

Према Рекеру[г] log P_{ow} израчунава се на следећи начин:

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

при чему:

f_i јесу константе различитих фрагмената молекула;

a_i јесте учесталост различитих фрагмената молекула у молекулу који се испитује.

Корекциони чланови могу се изразити као производ интеграла са једном константом Cm (тзв. магична константа). Вредности константи за f_i и c_m утврђене су на основу података из списка у коме се налази 1054 експериментално одређених вредности P_{ow} (825 једињења), применом регресионе анализе[3, 8]. Одређивање интеракцијских термина спроводи се на основу правила датих у литератури [5, 8, 9].

Ханш-Леов метод

Према Ханшу и Леу[3] вредност log P_{ow} израчунава се из једначине:

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

при чему:

f_i јесу константне различитих фрагмената молекула;

F_j јесте корективна вредност;

а a_i и b_j јесте одговарајућа учесталост налажења у молекулу.

Изведене на основу вредности P_{ow} утврђених експерименталним путем, вредности константи атома и група у молекулу и корективне вредности F_j (тзв. фактори) из списка одређене су методом покушаја и грешака. Корективне вредности подељене

су у неколико различитих класа[1, 3]. Релативно је компликовано и одузима доста времена да се води рачуна о свим правилима и свим корективним вредностима. У ту сврху развијени су одговарајући софтвери[2].

Комбинована метода

Израчунавање log P вредности код сложених молекулских структура се знатно побољшава, уколико се молекул раздвоји у веће подструктуре за које постоје поуздане log P вредности, које су доступне у табелама[2, 3] или на основу сопствених мерења. Такви фрагменти (нпр. хетероциклична једињења, антрахинон, азобензен) потом се могу комбиновати са Ханшовим п вредностима или Рекеровим или Леовим константама.

Напомене:

1) Метода израчунавања се примењује на делимично или потпуно јонизована једињења када је могуће узети у обзир неопходне корективне факторе.

2) Уколико се претпоставља постојање водоничних веза, додају се одговарајући корективни фактори (око + 0,6 до + 1,0 log P_{ow} јединица). Присуство таквих веза у молекулу се претпоставља на основу стерео модела или на основу анализе спектроскопских података молекула.

3) Уколико је могуће више таутомерних облика, користи се највероватнији облик као основу за прорачуне.

4) Пажљиво се прате ревизије списка са константама фрагмената молекула.

Извештај

Када се користи метода прорачуна/процене извештај о извршеном испитивању садржи:

– опис супстанце (смеша, нечистоће, итд.);

– индикације о могућим водоничним везама, дисоцијацији, наелектрисању и свим другим ефектима (нпр. таутомерији);

– опис методе израчунавања;

– идентификација базе података;

– особености при избору фрагмената;

– опсежна документација о прорачунима.

Литература

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

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

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

4. A. Leo, C. Hansch, D. Elkins, Chem. Rev., 1971, vol. 71,525.

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

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

7. R.F. Rekker, The Hydrophobic Fragmental Constant, Pharmacochemistry Library, Elsevier, NewYork, 1977,vol.1.

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

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

Део трећи
РЕФЕРЕНТНЕ СУПСТАНЦЕ ЗА HPLC

Бр.	Референтна супстанца	log Pow	pKa
1	2-бутанон	0,3	
2	4-ацетилпиридин	0,5	
3	анилин	0,9	
4	ацетанилид	1,0	

5	бензил алкохол	1,1	
6	*p*-метоксифенол	1,3	pKa = 10,26
7	феноксисирћетна киселина	1,4	pKa = 3,12
8	фенол	1,5	pKa = 9,92
9	2,4-динитрофенол	1,5	pKa = 3,96
10	бензонитрил	1,6	
11	фенилацетонитрил	1,6	
12	4-метилбензил алкохол	1,6	
13	ацетофенон	1,7	
14	2-нитрофенол	1,8	pKa = 7,17
15	3- нитробензоева киселина	1,8	pKa = 3,47
16	4-хлоранилин	1,8	pKa = 4,15
17	нитробензен	1,9	
18	цимет алкохол	1,9	
19	бензоева киселина	1,9	pKa=4,19
20	*p*-крезол	1,9	pKa=10,17
21	циметна киселина	2,1	pKa=3,89 cis 4,44 trans
22	анизол	2,1	
23	метил-бензоат	2,1	
24	бензен	2,1	
25	3-метилбензоева киселина	2,4	pKa = 4,27
26	4-хлорфенол	2,4	pKa = 9,1
27	трихлоретен	2,4	
28	атразин	2,6	
29	етилбензоат	2,6	
30	2,6-дихлорбензонитрил	2,6	
31	3-хлорбензоева киселина	2,7	pKa = 3,82
32	толуен	2,7	
33	1-нафтол	2,7	pKa = 9,34
34	2,3-дихлоранилин	2,8	
35	хлорбензен	2,8	
36	алилфенил етар	2,9	
37	бромбензен	3,0	
38	етилбензен	3,2	
39	бензофенон	3,2	
40	4-фенилфенол	3,2	pKa=9,54
41	тимол	3,3	

42	1,4-дихлорбензен	3,4	
43	дифениламин	3,4	pKa = 0,79
44	нафтален	3,6	
45	фенил-бензоат	3,6	
46	изопропилбензен	3,7	
47	2,4,6-трихлорфенол	3,7	pKa = 6
48	бифенил	4,0	
49	бензил-бензоат	4,0	
50	2,4-динитро-6 *sec*-бутилфенол	4,1	
51	1,2,4-трихлорбензен	4,2	
52	додеканска киселина	4,2	
53	дифенил-етар	4,2	
54	n-бутилбензен	4,5	
55	фенантрен	4,5	
56	флуорантен	4,7	
57	дибензил	4,8	
58	2,6-дифенилпиридин	4,9	
59	трифениламин	5,7	
60	ДДТ	6,2	

А.9. ТАЧКА ПАЉЕЊА

1. МЕТОДА ИСПИТИВАЊА

1.1. УВОД

Пре извођења испитивања корисно је имати податке о запаљивости супстанце. Поступак испитивања примењује се на течне супстанце чије се паре могу запалити извором паљења. Дате методе поуздане су само за опсеге тачке паљења који су дати у појединачним методама.

Приликом избора методе која ће се примењивати у поступку испитивања, узима се у обзир могућност појаве хемијских реакција између супстанце и посуде за узорак.

1.2. ДЕФИНИЦИЈЕ И МЕРНЕ ЈЕДИНИЦЕ

Тачка паљења јесте најнижа температура, коригована на притисак од 101,325 kPa, при којој течност производи пару у условима дефинисаним у овој методи, у довољној количини за стварање запаљиве смеше паре и ваздуха у том суду.

Мерне јединице: степен Целзијуса (°C).

$t = T - 273,15$

при чему:

t јесте температура у степенима Целзијуса (°C);

T јесте температура у степенима келвина (K).

1.3. РЕФЕРЕНТНЕ СУПСТАНЦЕ

Приликом испитивања нове супстанце није потребно у свим случајевима користити референтне супстанце. Оне пре свега служе за повремену проверу методе, као и да омогуће поређење са резултатима осталих метода.

1.4. ПРИНЦИП МЕТОДЕ

Супстанца се уноси у суд за испитивање и загрева се или се хлади до температуре испитивања у складу са поступком описаним у појединачној методи испитивања. Испитивање паљења врши се ради утврђивања да ли се узорак пали на

температури испитивања.

1.5. КРИТЕРИЈУМИ КВАЛИТЕТА

1.5.1. Поновљивост

Поновљивост варира према опсегу тачке паљења и методе која се користи, максимално 2° C.

1.5.2. Осетљивост

Осетљивост зависи од коришћене методе испитивања.

1.5.3. Специфичност

Специфичност неких метода ограничена је опсегом тачке паљења и зависи од својстава супстанце (нпр. висока вискозност).

1.6. ОПИС МЕТОДЕ

1.6.1. Припрема

Узорак супстанце за испитивање уноси се у апаратуру за испитивање у складу са одељком 1.6.3.1, односно са одељком 1.6.3.2. ове методе.

Када се испитују енергијом богате или токсичне супстанце, из сигурносних разлога се препоручује примена методе која користи мању количину узорка, око 2 cm^3.

1.6.2. Услови испитивања

Уређај се поставља у положај у ком нема спољашњих утицаја, водећи рачуна о безбедности.

1.6.3. Поступак испитивања

1.6.3.1. Метода равнотеже

Видети стандарде: SRPS EN ISO 1516, SRPS EN ISO 3680, SRPS EN ISO 1523, SRPS EN ISO 3679.

1.6.3.2. Метода неравнотеже

Метода по Абелу

Видети стандард: SRPS EN ISO 13736.

Метода по Абел-Пенском апаратура

Видети стандард: SRPS B.H8.047.

Метода по Тагу[XXIV]

Метода по Пенски-Мартенсу

Видети стандард: SRPS EN ISO 2719.

Напомене:

Када тачка паљења, одређена методом неравнотеже из одељка 1.6.3.2. ове методе, износи 0° C ± 2° C, 21° C ± 2° C или 55° C ± 2° C, тачку паљења је потребно потврдити методом равнотеже уз употребу исте апаратуре.

За давање података користе се искључиво методе које дају температуру тачке паљења.

За одређивање тачке паљења вискозних течности (боје, лепкови и сл.) које садрже растваваче, могу се користити апаратура и методе који су прикладни за одређивање тачке паљења вискозних течности.

Видети стандарде: SRPS EN ISO 3679, SRPS EN ISO 3680, SRPS EN ISO 1523.

_____

XXIV ASTM D 56

2. ИЗВЕШТАЈ О ИСПИТИВАЊУ

Извештај о испитивању, уколико је могуће, садржи:

– тачан опис супстанце (идентификацију и нечистоће);

– податке о коришћеној методи, као и могућим одступањима;

– резултате и додатне напомене значајне за тумачење резултата.

А.10. ЗАПАЉИВОСТ (ЗА ЧВРСТЕ СУПСТАНЦЕ)

1. МЕТОДА ИСПИТИВАЊА

1.1. УВОД

Пре извођења испитивања корисно је имати податке о могућим експлозивним својствима супстанце.

Ово испитивање примењује се искључиво на прашкасте супстанце, супстанце у облику пасте или у гранулама.

Како би се избегло да се у ову категорију сврстају све запаљиве супстанце, већ само оне које брзо горе или супстанце чије је понашање у току горења на било који начин опасно, у категорију лако запаљивих сврставају се само супстанце чија брзина сагоревања прелази утврђене граничне вредности.

Посебну опасност представља ширење усијања кроз метални прах због потешкоћа које се могу јавити при гашењу пожара. Метални прах се сматра високо запаљивом супстанцом уколико подржава ширење усијања кроз масу у одређеном временском року.

1.2. МЕРНЕ ЈЕДИНИЦЕ

Време сагоревања изражава се у секундама.

1.3. РЕФЕРЕНТНЕ СУПСТАНЦЕ

Нису прописане.

1.4. ПРИНЦИПИ МЕТОДЕ

Супстанца се обликује у виду непрекидне траке или непрекидног прашкастог трага дужине 250 mm. Прелиминарно испитивање врши се са циљем да се утврди да ли долази до ширења горења са развојем пламена или до тињања када се супстанца запали пламеником на гас. Уколико се ватра прошири у дужини од 200 mm у одређеном временском року, спроводи се комплетно испитивање како би се утврдила брзина сагоревања.

1.5. КРИТЕРИЈУМИ КВАЛИТЕТА

Нису прописани.

1.6. ОПИС МЕТОДЕ

1.6.1. Прелиминарно испитивање

Супстанца се обликује у виду непрекидне траке или непрекидног прашкастог трага дужине 250 mm, ширине 20 mm и висине 10 mm на незапаљивој, непорозној подлози која слабо проводи топлоту. Врео пламен из пламеника на гас (минимални пречник 5 mm) приноси се једном крају прашкастог трага супстанце све док се прах не запали или максимално 2 минута (5 минута за метални прах или легуре метала). Прати се да ли се горење шири кроз траг у дужини од 200 mm у року од 4 минута (или 40 минута за метални прах). Уколико се у року од 4 минута (или 40 минута за метални прах) супстанца не запали и горење се не прошири уз развијање пламена или тињање у дужини од 200 mm прашкастог трага испитиване супстанце, супстанца се не сматра лако запаљивом и није потребно вршити даље испитивање. Уколико се за мање од 4 минута, или за мање од 40 минута када је реч о металном праху, испитивана супстанца запали и пожар се прошири по узорку у дужини од 200 mm, примењује се поступак из одељка 1.6.2. ове методе и осталих одељака.

1.6.2. Одређивање брзине горења

1.6.2.1. Припрема

Прашкаста или супстанца у гранулама наспе се у калуп дужине 250 mm са попречним пресеком у облику троугла унутрашње висине 10 mm и ширине 20 mm. Са обе стране калупа монтирају се две металне плоче као странични граничници који прелазе горњу ивицу калупа за 2 mm (видети Слику). Калуп се затим три пута испусти са висине од 2 cm на чврсту подлогу. Уколико је потребно калуп се поново напуни. Попречни граничници се затим скину, а вишак супстанце очисти. Преко калупа се ставља плоча од незапаљивог, непорозног материјала који слабо проводи топлоту, цела апаратура се окрене наопако, а затим се уклони калуп.

Супстанце у облику пасте размажу се по подлози која је направљена од незапаљивог, непорозног материјала који слабо проводи топлоту у облику ужета дужине 250 mm са попречним пресеком око 1 cm^2.

1.6.2.2. Услови испитивања

У случају супстанци које су осетљиве на влагу испитивање се изводи што је брже могуће након што се супстанца извади из посуде.

1.6.2.3. Поступак испитивања

Формира се узорак и поставља у дигестор.

Брзина протока ваздуха треба да буде довољна да спречи ширење дима лабораторијом и да се не мења током испитивања. Око апаратуре се подигне заклон. Врео пламен из пламеника на гас (минимални пречник 5 mm) користи се да се запали супстанца на једном крају. Када се супстанца упали са раздаљине од 80 mm, на наредних 100 mm мери се брзина горења. Испитивање се понавља шест пута, и сваки пут се користи чиста хладна плоча, осим уколико се раније добију позитивни резултати.

2. ПОДАЦИ

За процену су значајни подаци о: времену сагоревања добијеном на прелиминарном испитивању (одељак 1.6.1. ове методе) и најкраћем времену сагоревања од највише шест испитивања (одељак 1.6.2.3. ове методе).

3. ИЗВЕШТАВАЊЕ

3.1. ИЗВЕШТАЈ О ИСПИТИВАЊУ

Извештај о испитивању, ако је могуће, садржи:

– прецизан опис супстанце (идентификација и нечистоће);

– опис супстанце која се испитује, њено физичко стање укључујући садржај влаге;

– резултате прелиминарног испитивања и испитивања за утврђивање брзине сагоревања, уколико је извршено;

– све додатне податке значајне за тумачење резултата.

3.2. ТУМАЧЕЊЕ РЕЗУЛТАТА

Прашкасте супстанце и супстанце у облику грнула или пасте сматрају се лако запаљивима када је време сагоревања на било ком од спроведених испитивања описаних у одељку 1.6.2. ове методе мање од 45 секунди. Метални прах или легуре метала сматрају се лако запаљивим супстанцама када се могу запалити или се зона реакције прошири на цео узорак у року од 10 минута или мање.

4. ЛИТЕРАТУРА

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

Слика: Калуп и прибор за припрему узорка за испитивање (Све димензије изражене су у милиметрима)

Дужина калупа: 250
Материјал: алуминијум

А.11. ЗАПАЉИВОСТ (ЗА ГАСОВЕ)

1. МЕТОДА ИСПИТИВАЊА

1.1. УВОД

Овом методом утврђује се да ли су гасови запаљиви у смеши са ваздухом на собној температури (око 20° C) и атмосферском притиску, и ако јесу, у којим опсезима концентрација. Смеше испитиваног гаса (у растућим концентрацијама) и ваздуха излажу се дејству електричне варнице и посматра се да ли долази до паљења.

1.2. ДЕФИНИЦИЈЕ

Опсег запаљивости јесте опсег концентрација између доње и горње границе експлозивности. Доња и горња граница експлозивности јесу оне граничне концентрације запаљивих гасова у смеши са ваздухом код којих не долази до појаве пламена.

1.3. РЕФЕРЕНТНЕ СУПСТАНЦЕ

Нису прописане.

1.4. ПРИНЦИП МЕТОДЕ

Концентрација гаса у ваздуху повећава се постепено и смеша се сваки пут излаже електричној варници.

1.5. КРИТЕРИЈУМИ КВАЛИТЕТА

Нису прописани.

1.6. ОПИС МЕТОДЕ

1.6.1. Апаратура

Посуда за испитивање јесте усправни стаклени цилиндар минималног унутрашњег пречника 50 mm и минималне висине 300 mm. Електроде за паљење постављају се на растојању од 3 mm до 5 mm и 60 mm изнад дна цилиндра. Цилиндар има отвор за одушак. Апаратура се заштићује да би се спречила евентуална оштећења услед експлозије.

Као извор паљења користи се стандардна индукциона варница трајања 0,5 секунди, коју производи високонапонски трансформатор излазног напона од 10 kV до 15 kV (максималне снаге 300 W). Пример одговарајуће апаратуре дат је у литератури[2].

1.6.2. Услови испитивања

Испитивање се изводи на собној температури (око 20° C).

1.6.3. Поступак испитивања

У стаклени цилиндар се помоћу пумпи уводи позната концентрација гаса у ваздуху. Варница се пропушта кроз смешу и посматра се да ли се пламен одваја од извора паљења и да ли се развија самостално. Концентрација гаса се мења у корацима од 1% запремински све док не дође до паљења.

Ако хемијска структура гаса указује да је он незапаљив и ако се израчуна састав стехиометријске смеше са ваздухом, онда се само смеше у опсегу 10% мање од стехиометријског састава до 10% више од овог састава испитују у корацима од 1% запремински.

2. ПОДАЦИ

Једини значајан податак за одређивање овог својства је појава и развој пламена.

3. ИЗВЕШТАВАЊЕ

Извештај о испитивању, уколико је могуће, садржи:

– прецизан опис супстанце (идентификацију и нечистоће);

– опис коришћене апаратуре са њеним димензијама;

– температуру на којој је супстанца испитивана;

– испитане концентрације и добијене резултате;

– резултат испитивања: незапаљиви гас или лако запаљиви гас;

– уколико је закључено да је гас незапаљив, уносе се подаци о опсегу концентрација који је испитан у корацима од 1% запремински;

– све податке и напомене значајне за тумачење резултата.

4. ЛИТЕРАТУРА

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

2. W. Berthold, D. Conrad, T. Grewer, H. Grosse-Wortmann 'Entwicklung einer Standard-Apparatur zur Messung von Explosionsgrenzen'. Chem.-Ing.-Tech. 1984, vo1. 56, 2, 126-127. , T. Redeker und H. Schacke, p. 126-127.

А.12. ЗАПАЉИВОСТ (У КОНТАКТУ СА ВОДОМ)

1. МЕТОДА ИСПИТИВАЊА

1.1. УВОД

Овом методом испитивања утврђује се да ли се у реакцији супстанце са водом или влажним ваздухом развијају опасне количине гаса или гасова који могу бити веома запаљиви.

Метода се примењује и на чврсте и на течне супстанце, а не примењује се на супстанце које се спонтано пале у контакту са ваздухом.

1.2. ДЕФИНИЦИЈЕ

Веома запаљива супстанца јесте супстанца која у контакту са водом или влажним ваздухом развија веома запаљиве гасове у опасним количинама, минималном брзином од 1 L/kg по сату.

1.3. ПРИНЦИПИ МЕТОДЕ

Супстанца се испитује поступно (корак по корак) како је описано у овом одељку. Уколико се у било ком кораку развије пламен, испитивање се не наставља. Уколико је познато да супстанца не развија бурну реакцију са водом, наставља се са спровођењем испитивања до корака 4 (видети одељак 1.3.4. ове методе).

1.3.1. Корак 1

Супстанца која се испитује ставља се у посуду са дестилованом водом температуре 20° C и прати се да ли ће се запалити гасови који се при том развијају.

1.3.2. Корак 2

Испитивана супстанца ставља се на филтер папир који плута по површини посуде са дестилованом водом температуре 20° C и прати се да ли ће се запалити гасови који се при том развијају.

Филтер папир се ставља да би задржао супстанцу на једном месту чиме се повећава могућност да се она запали.

1.3.3. Корак 3

Испитивана супстанца формира се у облику гомиле висине око 2 cm и пречника око 3 cm. На тако направљену гомилу дода се неколико капи воде и прати се да ли ће се запалити гасови који се при том развијају.

1.3.4. Корак 4

Супстанца која се испитује меша се са дестилованом водом температуре од 20° C и мери се брзина развијања гасова у периоду од седам сати, у интервалима од једног сата. Уколико је брзина развијања гасова променљива, или уколико се стално повећава, након седам сати мерења, време посматрања се продужава максимално до пет дана. Испитивање се може прекинути када брзина развијања гасова пређе 1 L/kg на сат.

1.4. РЕФЕРЕНТНЕ СУПСТАНЦЕ

Нису прописане.

1.5. КРИТЕРИЈУМИ КВАЛИТЕТА

Нису прописани.

1.6. ОПИС МЕТОДЕ

1.6.1. Корак 1

1.6.1.1. Услови испитивања

Испитивање се изводи на собној температури (око 20° C).

1.6.1.2. Поступак испитивања

Малу количину супстанце која се испитује (око 2 mm у пречнику) ставити у посуду са дестилованом водом. Прати се да ли се развија неки гас и да ли се тај гас пали. Уколико се запали гас који се тако развио не наставља се са испитивањем супстанце јер се она сматра опасном.

1.6.2. Корак 2

1.6.2.1. Апаратура

Филтер папир који плута по површини дестиловане воде у одговарајућем суду, нпр. шољи за упаравање пречника 100

mm.

1.6.2.2. Услови испитивања

Испитивање се изводи на собној температури (око 20° C).

1.6.2.3. Поступак испитивања

Малу количину супстанце која се испитује (око 2 mm у пречнику) ставити на центар филтер папира. Прати се да ли се развија неки гас и да ли се тај гас пали. Уколико се запали гас који се тако развио не наставља се са испитивањем супстанце јер се она сматра опасном.

1.6.3. Корак 3

1.6.3.1. Услови испитивања

Испитивање се изводи на собној температури (око 20° C).

1.6.3.2. Поступак испитивања

Супстанца која се испитује формира се у облику гомиле висине око 2 cm и пречника око 3 cm са улегнућем на врху. Неколико капи воде убаци су у шупљину формирану на врху гомиле и прати се да ли се развија неки гас и да ли се тај гас пали. Уколико се запали гас који се тако развио не наставља се са испитивањем супстанце јер се она сматра опасном.

1.6.4. Корак 4

1.6.4.1. Апаратура

Апаратура се поставља као што је приказано на Слици.

1.6.4.2. Услови испитивања

Прегледати посуду у којој се налази супстанца која ће се испитивати и утврдити да ли садржи материје у праху величине честица < 500 µm. Уколико прашкасте материје чине више од 1% масеног од укупне количине супстанце или уколико је узорак трошан, пре испитивања читава супстанца се спраши како би се приликом паковања и руковања омогућило смањење величине честица супстанце. У супротном, супстанца се испитује у облику у коме је добијена. Испитивање се изводи на собној температури (око 20° C) и при атмосферском притиску.

1.6.4.3. Поступак испитивања

У капалицу се сипа 10 ml до 20 ml воде, а 10 g супстанце стави се у ерленмајер. Запремина гасова који се при том издвајају мери се на било који одговарајући начин. Славина на капалици отвори се тако да вода капље у ерленмајер и укључи се штоперица. Издвајање гасова проверава се на сваких сат времена током периода од седам сати. Уколико је брзина издвајања гасова променљива, или уколико се стално повећава, након седам сати мерења, мерење се продужава највише до пет дана. Испитивање се може прекинути у било ком тренутку мерења ако брзина развијања гасова пређе 1 L/kg на сат. Ово испитивање врши се три пута.

Анализира се хемијски састав гаса уколико је непознат. Када гас садржи веома запаљиве састојке, а није познато да ли је читава смеша веома запаљива, прави се смеша истог састава и испитује се у складу са методом А.11. која је дата у овом прилогу.

2. ПОДАЦИ

Супстанца се сматра опасном уколико:

– долази до спонтаног паљења у било ком кораку поступка испитивања;

– долази до издвајања запаљивог гаса брзином већом од 1 L/kg супстанце на сат.

3. ИЗВЕШТАВАЊЕ

Извештај о испитивању, уколико је могуће, садржи:

– прецизан опис супстанце (идентификација и садржај нечистоћа);

– детаље о претходним припремама супстанце;

– резултате испитивања (кораци 1, 2 ,3 и 4 дати у одељку 1.6. ове методе);

– хемијски састав издвојеног гаса;

– брзину издвајања гаса уколико је примењен корак 4 (дат у одељку 1.6.4. ове методе);

– додатне напомене важне за тумачење резултата.

4. ЛИТЕРАТУРА

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.

Слика: Апаратура

А.13. САМОЗАПАЉИВОСТ
(ЗА ЧВРСТЕ И ТЕЧНЕ СУПСТАНЦЕ И СМЕШЕ)

1. МЕТОДА ИСПИТИВАЊА

1.1. УВОД

Испитивање се примењује на чврсте и течне супстанце које се, у малим количинама, спонтано пале убрзо после контакта са ваздухом на собној температури (око 20° C).

Овом методом се не испитују супстанце које се, пре него што се запале, излажу ваздуху сатима или данима на собној или повишеној температури.

1.2. ДЕФИНИЦИЈЕ

Сматра се да су супстанце самозапаљиве уколико се пале или изазивају угљенисање при условима из одељка 1.6. ове методе.

Може се указати потреба за испитивањем самозапаљивости течности према методи А.15. Температура самозапаљења (за течности и гасове) датој у овом прилогу.

1.3. РЕФЕРЕНТНЕ СУПСТАНЦЕ

Нису прописане.

1.4. ПРИНЦИП МЕТОДЕ

Супстанца се, било да је у чврстом или течном стању, додаје на инертни носач и доводи у контакт са ваздухом на собној температури у периоду од пет минута. Уколико се течна супстанца не запали, апсорбује се у филтер папир и изложи ваздуху на собној температури (око 20° C) у периоду од пет минута. Ако се чврста или течна супстанца запале, или ако течна супстанца запали или угљенише филтер папир, супстанца се сматра самозапаљивом.

1.5. КРИТЕРИЈУМИ КВАЛИТЕТА

Поновљивост: због значаја за безбедност један позитиван резултат је довољан да би се супстанца сматрала самозапаљивом.

1.6. ОПИС МЕТОДЕ

1.6.1. Апаратура

Порцеланска шоља пречника око 10 cm пуни се дијатомејском земљом до висине од око 5 mm на собној температури (око 20° C).

Напомена: Дијатомејска земља или било која друга слична инертна супстанца која је уобичајено доступна узима се као репрезентативни узорак земљишта на који се испитивана супстанца сипа у случају акцидента (незгоде).

За испитивање течности користи се суви филтер папир који се не пали у контакту са ваздухом када дође у додир са инертним носачем.

1.6.2. Поступак испитивања

а) Прашкасте чврсте супстанце и смеше

Сипа се 1 cm^3 до 2 cm^3 супстанце која се испитује са око 1 cm висине на незапаљиву површину. Затим се посматра да ли се супстанца пали током капања или у року од пет минута стајања. Испитивање се понавља шест пута, осим ако не дође до паљења.

б) Течности

Сипа се око 5 cm^3 течности која се испитује у за то припремљену порцуланску шољу. Затим се посматра да ли се супстанца запали у року од пет минута.

Уколико у шест испитивања не дође до паљења, врши се следеће испитивање: шприцем се нанесе 0,5 ml узорка за испитивање на удубљени филтер папир. Затим се посматра да ли долази до паљења или угљенисања филтер папира у року од пет минута од наношења течности. Испитивање се понавља три пута, осим ако не дође до паљења или угљенисања.

2. ПОДАЦИ

2.1. ОБРАДА РЕЗУЛТАТА

Испитивање се може прекинути кад се уоче позитивни резултати код било ког испитивања.

2.2. ПРОЦЕНА

Сматра се да је супстанца самозапаљива ако се запали у року од пет минута по додавању те супстанце на носач и након излагања ваздуху, или ако течност угљенише или запали филтер папир у року од пет минута од наношења на папир и излагања ваздуху.

3. ИЗВЕШТАВАЊЕ

Извештај, уколико је могуће, садржи:

– прецизан опис супстанце (идентификацију и садржај нечистоћа);

– резултате испитивања;

– све додатне напомене важне за тумачење резултата.

4. ЛИТЕРАТУРА

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.14. ЕКСПЛОЗИВНОСТ

Део први

1. МЕТОДА ИСПИТИВАЊА

1.1. УВОД

Ова метода описује поступак испитивања којим се утврђује да ли чврста супстанца или супстанца у облику пасте представљају потенцијално опасне супстанце које могу лако да експлодирају када се изложе пламену (термичка осетљивост), удару или трењу (осетљивост на механички стимулус), и да ли течна супстанца развија експлозивно дејство када се изложи дејству пламена или удару.

Метода се састоји из три дела:

1. испитивање термичке осетљивости[1];

2. испитивање механичке осетљивости у односу на удар[1];

3. испитивање механичке осетљивости у односу на трење[1].

Овом методом добијају се подаци за процену вероватноће изазивања експлозије супстанце применом уобичајених стимулуса. Метода није намењена за утврђивање да ли супстанца може да експлодира под било којим условима.

Применом ове методе утврђује се да ли супстанца има експлозивна својства (термичка и механичка осетљивост) под одређеним условима. Заснива се на примени више типова апаратура за испитивање које се најчешће користе у свету[1] и које дају добре резултате. Ова метода није дефинитивна. Могу се користити и алтернативне апаратуре ако су прихваћене на међународном нивоу и да се резултати таквих испитивања могу довести у везу и поредити са резултатима добијеним применом прописане апаратуре.

Испитивање се не спроводи када доступни подаци о термодинамичким својствима (нпр. топлота настајања, топлота разлагања супстанце) и/или одсуство одређених реактивних група[2] у структурној формули омогућавају да се довољно поуздано утврди да супстанца нема својства која доводе до њеног брзог разлагања уз издвајање гасова и ослобађање топлоте (тј. материјал не представља ризик од експлозије). Код течних супстанци се не спроводи испитивање механичке осетљивости у односу на трење.

1.2. ДЕФИНИЦИЈЕ

Експлозиви јесу супстанце које могу да експлодирају под дејством пламена или супстанце које су осетљиве на удар или трење при примени прописане апаратуре за испитивање (или су осетљивије на механичке ударе од 1,3-динитробензена ако се примењују алтернативне апаратуре за испитивање).

1.3. РЕФЕРЕНТНЕ СУПСТАНЦЕ

1,3-динитробензен, технички кристалан производ просејан кроз сито димензија 0,5 mm за потребе испитивања реакције на удар или трење.

Перхидро-1,3,5-тринитро-1,3,5-триазин (RDX, хексоген, циклонит- CAS 121-82-4) прекристалисан из воденог раствора циклохексанона, који је потом просејан на влажном путу кроз сито величине 250 µm и задржан на ситу величине 150 µm, а потом осушен на температури од 103° C ± 2° C (током 4 сата) ради спровођења друге серије испитивања осетљивости на трење и удар.

1.4. ПРИНЦИП МЕТОДЕ

Прелиминарна испитивања неопходна су да би се утврдили безбедносни услови за извођење три испитивања осетљивости.

1.4.1. Испитивање безбедности при руковању супстанцом[3]

Из безбедносних разлога, пре него што се приступи извођењу основног испитивања, мале количине узорка (око 10 mg) испитиване супстанце загревају се на отвореном, гасним пламеником, излажу се ударцу – уз примену одговарајуће апаратуре и трењу – уз употребу чекића и наковња или другог уређаја за испитивање трења. Циљ овог испитивања јесте да се утврди да ли је супстанца толико осетљива и експлозивна да се описана испитивања, а пре свега испитивања њене термичке осетљивости, спроводе уз посебне мере безбедности како лице које спроводи испитивања не би било повређено.

1.4.2. Термичка осетљивост

Ова метода подразумева загревање супстанце у челичној цеви, затвореној помоћу пригушница са различитим пречником отвора, како би се утврдило да ли супстанца експлодира при интензивном загревању у затвореној средини.

1.4.3. Механичка осетљивост (удар)

Овом методом супстанца се излаже удару који изазива одређена маса која се испусти на супстанцу са одређене висине.

1.4.4. Механичка осетљивост (трење)

Овом методом чврста супстанца или супстанца у облику пасте излаже се трењу између стандардних површина под одређеним условима оптерећења и релативног кретања.

1.5. КРИТЕРИЈУМИ КВАЛИТЕТА

Нису прописани.

1.6. ОПИС МЕТОДЕ

1.6.1. Термичка осетљивост (утицај пламена)

1.6.1.1. Апаратура

Апаратура се састоји од челичне цеви за једнократну употребу и вишенаменских запушача (Слика 1), који се постављају у сигурносни уређај за загревање. Свака цев израђује се обликовањем под пресом од челичног лима (видети Део други ове методе) и има унутрашњи пречник 24 mm, дужину 75 mm и дебљину зидова 0,5 mm. Цеви се на отвореном крају

обрађују тако да се могу затворити пригушницом. Пригушница је отпорна на притисак, има централни отвор, и причвршћује се за цев дводелним вијком (са навојем и матицом). Навоји вијка су израђени од високо легираног челика са хромом и манганом (видети Део други ове методе) који је отпоран на високе температуре које могу ићи и до 800° C. Пригушнице су дебљине 6 mm, начињене од челика отпорног на топлоту (видети Део други ове методе), различитих величина отвора.

1.6.1.2. Услови испитивања

Супстанца се испитује у стању у коме је добијена. Изузетно, нпр. уколико је супстанца пресована, изливена или на други начин компримована, може се најпре здробити а потом испитати.

Код супстанци у чврстом стању, маса материјала који се испитује одређује се сувим поступком у две фазе. Тарирана цев напуни се са 9 cm^3 супстанце и сабије уз примену силе од 80 N на попречни пресек цеви. Из безбедносних разлога или у случајевима када физички облик узорка може бити измењен због компресије користи се неки други начин пуњења, нпр. ако је супстанца веома осетљива на трење онда се не примењује метод сабијања. Уколико је материјал компресибилан додаје се још материјала све док се не дође до границе од 55 mm испод врха цеви. Затим се одреди укупна маса супстанце која је потребна да се дође до ове границе од 55 mm испод врха цеви и додају се још две количине, при чему се сваки пут за сабијање користи сила од 80 N. Затим се или дода још материјала или се он одвади тако да остане количина у висини од 15 mm у односу на врх цеви. Изврши се друга провера на суво уз употребу количине која одговара трећини сабијене масе коришћене код прве суве пробе. Још два пута се додаје супстанца и то она која је претходно одвађена. Сваки пут за сабијање користи се сила од 80 N, све док ниво супстанце не дође до висине од 15 mm испод врха цеви. Количина чврсте супстанце измерена приликом друге суве пробе користи се при сваком даљем испитивању. Пуњење се врши у три једнаке количине, од којих се свака компресује до 9 cm^3 уз употребу одговарајуће силе. (Поступак се олакшава употребом прстена за прављење прореда.)

Течности и гелови сипају се у цев до висине од 60 mm, водећи рачуна да се код гелова не стварају шупљине. Навојна обујмица се навуче на цев одоздо и убацује се одговарајућа пригушница. Навој се затеже након што се нанесе одређена количина лубриканта на бази молибден-дисулфида. Важно је проверити да нема супстанце између прирубнице и плоче или на навојима.

Загревање се врши пропаном из индустријских боца које имају регулатор притиска (60 mbar до 70 mbar) који омогућава његову равномерну дистрибуцију (на шта упућује визуелна провера пламена у горионицима) цевоводима до четири горионика. Горионици се распоређују око коморе за испитивање као што је приказано на Слици 1. Четири горионика имају комбиновану потрошњу од око 3,2 L пропана у минути.

Користе се и друга гасовита горива и другачији горионици, али брзина загревања треба да буде у складу са брзином датом на Слици 3. Код свих типова апаратура повремено се врши провера брзине загревања уз помоћ цеви које су напуњене дибутил-фталатом као што је приказано на Слици 3.

1.6.1.3. Поступак испитивања

Испитивања се изводе или док се цев не распадне или тако што се цев загрева пет минута. Када се при испитивању цев распадне на три или више делова, који могу бити међусобно спојени уским тракама метала као што је приказано на Слици 2, сматра се да је дошло до експлозије. Ако се приликом испитивања цев распала на мањи број делова или се није распала, сматра се да није дошло до експлозије.

Прво се спроводи серија од три испитивања са пречником отвора пригушнице од 6,0 mm. Уколико не дође до експлозије, врши се друга серија од три испитивања са пречником отвора пригушнице од 2,0 mm. Уколико при било којој од ових серија испитивања дође до експлозије не врше се даља испитивања.

1.6.1.4. Процена

Сматра се да је испитивање дало позитивне резултате када при било којој од наведених серија испитивања дође до експлозије.

1.6.2. Механичка осетљивост (удар)

1.6.2.1. Апаратура (Слика 4)

Основни делови типичне апаратуре са падајућим чекићем су: клада од ливеног челика са постољем, наковањ, колона, вођице, тегови, справа за отпуштање и држач узорка. Челични наковањ димензија: 100 mm (пречник) x 70 mm (висина) зашрафи се на горњу површину челичног блока димензија: 230 mm (дужина) x 250 mm (ширина) x 200 mm (висина) са ливеним постољем димензија: 450 mm (дужина) x 450 mm (ширина) x 60 mm (висина). Колона, сачињена од бешавне челичне цеви, причвршћује се за носач који је зашрафљен за задњи део челичног блока. Четири шрафа причвршћују опрему за чврст бетонски блок 60 cm x 60 cm x 60 cm тако да су шине вођица у вертикалном положају и да тегови падају слободно. Могу се користити тегови од 5 kg и 10 kg, направљени од чврстог челика. Ударни део тега направљен је од ојачаног челика, HRC 60 до 63 и има минимални пречник 25 mm.

Узорак који се испитује затвара се у уређај за испитивање осетљивости на удар који се састоји од два коаксијална цилиндра направљена од чврстог челика. Цилиндри су постављени један изнад другог и смештају се у шупаљ цилиндрични прстен од челика. Цилиндри од чврстог челика треба да буду пречника 10 mm (– 0,003 mm, – 0,005 mm) и висине 10 mm, исполиране површине, заобљених ивица (радијус закривљености 0,5 mm) и тврдоће HRC 58 до 65. Шупљи цилиндар има спољни пречник 16 mm, исполирану унутрашњост пречника 10 mm (+ 0,005 mm, + 0,010 mm) и висине 13 mm. Уређај за испитивање осетљивости на удар поставља се на наковањ (пречника 26 mm и висине 26 mm) који је направљен од челика и центрира се помоћу прстена са перфорацијама које омогућавају испуштање пара.

1.6.2.2. Услови испитивања

Запремина узорка је 40 mm^3 или одговара алтернативној опреми која се користи. Чврсте супстанце испитују се у сувом стању и припремају на следећи начин:

1) прашкасте супстанце сеју се кроз сито (величина сита 0,5 mm); све што прође кроз сито користи се за испитивање;

2) пресоване, изливене или на други начин компримоване супстанце ситне се у ситније комаде који се просеју. Просејани комади пречника између 0,5 mm и 1 mm користе се при испитивању и сматрају се узорцима оригиналне супстанце.

Супстанце које се испоручују у облику пасте испитују се у сувом стању кад год је могуће, или након уклањања што је могуће веће количине разређивача. Супстанце које се налазе у течном стању испитују се тако што се остави размак од 1 mm између горњег и доњег цилиндра.

1.6.2.3. Поступак испитивања

Врши се серија од 6 испитивања уз бацање тега масе од 10 kg са висине од 0,40 m (40 J). Уколико при серији испитивања од 40 J дође до експлозије, спроводи се још једна серија од 6 испитивања у којој се користе тегови масе од 5 kg који се бацају са висине од 0,15 m (7,5 J). Код другачије апаратуре узорак се пореди са одабраном референтном супстанцом по установљеној процедури (нпр. горе-доле техника, итд).

1.6.2.4. Процена

Резултати испитивања сматрају се позитивним када дође до експлозије (експлозија са ватром и/или стање еквивалентно експлозији) најмање код једног испитивања са описаним уређајем за испитивање осетљивости на удар или ако је узорак осетљивији од 1,3-динитробензола или RDX код алтернативног испитивања осетљивости на удар.

1.6.3. Механичка осетљивост (трење)

1.6.3.1. Апаратура (Слика 5)

Апаратура за испитивање осетљивости на трење састоји се од основне плоче од ливеног челика на коју се поставља апаратура за испитивање осетљивости на трење. Апаратура се састоји од фиксираног порцеланског клина и покретне порцеланске плоче. Порцеланска плоча се налази на клизачу који се покреће помоћу две вођице. Клизач је повезан са електромотором помоћу спојнице, ексцентра и одговарајућег преносног механизма који омогућава да се порцеланска плоча покрене, само једанпут: напред и назад испод порцеланског клина у дужини од 10 mm. Порцелански клин издржава оптерећење од, на пример, 120 N до 360 N.

Равне порцеланске плоче израђују се од белог техничког порцелана (храпавост 9 µm до 32 µm) и имају димензије: 25 mm (дужина) x 25 mm (ширина) x 5 mm (висина). Цилиндрични порцелански клин такође се израђује од белог техничког порцелана и има дужину 15 mm, пречник 10 mm и неравне сферне крајеве са полупречником закривљености од 10 mm.

1.6.3.2. Услови испитивања

Запремина узорка је 10 mm^3 или одговара алтернативној апаратури која се користи. Чврсте супстанце испитују се у сувом стању и припремају на следећи начин:

1) прашкасте супстанце сеју се кроз сито (величина сита 0,5 mm); све што прође кроз сито користи се за испитивање;

2) пресоване, изливене или на други начин компримоване супстанце уситне се на ситније комаде који се просеју. Просејани комади пречника < 0,5 mm користе се при испитивању.

Супстанце које се испоручују у облику пасте испитују се у сувом стању кад год је могуће. Уколико се супстанца не може довести у суво стање, паста (након уклањања што веће количине растварача) се испитује у филму дебљине 0,5 mm, ширине 2 mm и дужине 10 mm. Филм се прави помоћу шаблона.

1.6.3.3. Поступак испитивања

Порцелански клин доведе се у позицију изнад узорка и оптерети се. Када се спроводи испитивање, маркери нанети сунђером на порцеланској основи треба да стоје у трансверзалном положају у односу на правац кретања.

Води се рачуна да клин буде на узорку, да се довољна количина испитиваног материјала налази испод клина и да се подлога правилно покреће испод клина. Код супстанци у виду пасте користи се шаблон дебљине 0,5 mm са отвором димензија 2 mm x 10 mm да би се супстанца нанела на подлогу. Порцеланска подлога се креће 10 mm напред-назад испод порцеланског клина у времену од 0,44 секунде. Сваки део површине подлоге и клина користи се само једном. Два краја клина користе се у два испитивања, а две површине подлоге користе се за укупно три испитивања.

Серија од шест испитивања врши се са оптерећењем од 360 N. Уколико се током испитивања добију позитивни резултати спроводи се још једна серија од 6 испитивања са оптерећењем од 120 N. Када се користе други типови апаратура, узорак се пореди са изабраном референтном супстанцом уз примену утврђене процедуре (нпр. горе-доле техника и сл).

1.6.3.4. Процена

Резултати испитивања сматрају се позитивним уколико дође до експлозије (праска и/или праска уз развој пламена који се сматра еквивалентним експлозији) најмање једанпут током било ког испитивања са прописаном апаратуром за испитивање

осетљивости на трење или уколико задовољава еквивалентне критеријуме који се односе на алтернативно испитивање осетљивости на трење.

2. ПОДАЦИ

У складу са овим правилником, супстанца има потенцијалну опасност од експлозије уколико су добијени позитивни резултати у испитивању термичке осетљивости, осетљивости на удар или трење.

3. ИЗВЕШТАВАЊЕ

3.1. ИЗВЕШТАЈ О ИСПИТИВАЊУ

Извештај о испитивању, уколико је могуће, садржи податке о:

– идентитету, саставу, степену чистоће, садржају влаге итд. испитиване супстанце;

– физичком облику узорка и да ли је узорак мрвљен, ломљен и/или просејаван;

– запажањима током испитивања термичке осетљивости (нпр. маса узорка, број фрагмената у које се распрсао узорак итд.);

– запажањима током испитивања осетљивости на удар или трење (нпр. формирање одређене веће количине дима или потпуно разлагање без праска, пламена, варнице, пуцкетања и сл.);

– резултатима свих типова испитивања;

– уколико је коришћена алтернативна апаратура, научна оправдања као и доказ о односу резултата добијених применом прописане апаратуре и оних добијених уз примену еквивалентне апаратуре;

– свим коментарима који могу бити од користи за правилно тумачење резултата као што је реферисање на испитивање сличних производа;

– свим додатним примедбама релевантним за правилно тумачење резултата.

3.2. ТУМАЧЕЊЕ И ПРОЦЕНА РЕЗУЛТАТА

У извештају о спроведеним испитивањима наводе се и резултати који се могу сматрати лажним, неправилним или нерепрезентативним.

Уколико се неки резултати одбацују, даје се одговарајуће објашњење и резултати алтернативних или додатних тестова. Уколико се неки неправилни резултат не може објаснити, он се прихвата као номинална вредност и супстанца се адекватно сврстава на основу њега.

4. ЛИТЕРАТУРА

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, 6-13 and 30-42.

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

Део други
Пример спецификације материјала за испитивање термичке осетљивости[XXV]

1) Цев: Спецификација материјала бр. 1.0336.505 г

2) Пригушница: Спецификација материјала бр. 1.4873

3) Навојнице: Спецификација материјала бр. 1.3817.

Слика 1. Апаратура за испитивање термичке осетљивости (све димензије дате су у милиметрима)

1. Цев
2. Навојна обујмица
3. Пригушница a = 2,0 или 6,0 mm
4. Матица b = 10 mm
5. Површина са жлебовима
6. Две равне површине за кључ 41
7. Две равне површине за кључ 36
8. Кућиште отпорно на распрскавање
9. Две потпорне шипке за цев са узорком
10. Монтирана цев са узорком
11. Положај задњег пламеника (остали пламеници се не виде)
12. Млазница

Слика 2. Испитивање термичке осетљивости (пример фрагментације)

Слика 3. Калибрација брзине загревања за испитивање термичке осетљивости

Крива температура/време добијена загревањем дибутил фталата (27 cm^3) у затвореној цеви (1,5 mm пригушница) уз проток пропана од 3,2 литра/минут. Температура се мери уз помоћ термопара хромел (легура хром-никал 9:1)/алумел (легура Ni : Al : Mn : Si 95 : 2 : 2 : 1) обложеног нерђајућим челиком, који се поставља 43 mm испод ивице цеви. Брзина загревања између 135° C и 285° C треба да буде између 185 K/минут и 215 K/минут.

Слика 4. Апаратура за испитивање осетљивости на удар (све димензије су у милиметрима)

Слика 4а. Падајући маљ, предња и бочна страна

Слика 4б. Падајући маљ доњи део

При чему је:

1. Постоље 450 x 450 x 60
2. Челични блок 230 x 230 x 200
3. Наковањ ø 100 x 70
4. Колона
5. Средњи попречни носач
6. Вођице
7. Назубљени носач
8. Градуисана вага
9. Падајући маљ
10. Елемент за држање и отпуштање
11. Плоча за постављање у положај
12. Међунаковањ (замењиви) ø 26 x 26
13. Прстен са отворима
14. Уређај за удар

Слика 4ц.
Уређај за испитивање осетљивости на удар за чврсте супстанце и пасте

Слика 4д.
Уређај за испитивање осетљивости на удар течних супстанци

При чему је:
1.Челични цилиндри
2. Прстенаста вођица за челичне цилиндре
3. Прстен са отворима за постављање у положај
4. Гумени прстен
5. Течна супстанца 40 mm^3
6. Простор без течности

Слика 4е. Маљ (маса која пада 5 kg)
При чему је:
1. Прстен за качење
2. Показивач висине
3. Жлеб за позиционирање
4. Цилиндрична ударна глава
5. Одбојник

Слика 5. Уређај за испитивање осетљивости на трење

При чему је:
1. Челично постоље
2. Покретна вођица
3. Порцеланска плоча (коју држи вођица) 25 mm x 25 mm x 5 mm
4. Фиксни порцеландски клин ø 10 mm x 15 mm
5. Узорак који се испитује 10 mm^3
6. Држач клина
7. Ручка за пуњење
8. Противтег
9. Склопка
10. Коло за постављање вођице у почетни положај
11. Правац према електромоторном погону

_____

XXV Видети стандард DIN 1623.

А.15. ТЕМПЕРАТУРА САМОЗАПАЉЕЊА (ЗА ТЕЧНОСТИ И ГАСОВЕ)

1. МЕТОДА ИСПИТИВАЊА

1.1. УВОД

Овом методом се не испитују експлозивне супстанце и супстанце које се спонтано пале у контакту са ваздухом на собној температури. Испитивање се примењује на гасове, течности и испарења који у присуству ваздуха могу бити запаљени врелом површином.

Температуру самозапаљења могу значајно снизити присутне каталитичке нечистоће, површина материјала или већа запремина посуде за испитивање.

1.2. ДЕФИНИЦИЈЕ

Степен самозапаљивости изражава се у виду температуре самозапаљења.

Температура самозапаљења јесте најнижа температура при којој се испитивана супстанца запали када се помеша са ваздухом у условима дефинисаним у овој методи испитивања.

1.3. РЕФЕРЕНТНЕ СУПСТАНЦЕ

Референтне супстанце наведене су у стандардима (видети одељак 1.6.3. ове методе). Оне првенствено служе за повремену проверу методе и омогућавају поређење са резултатима других метода.

1.4. ПРИНЦИП МЕТОДЕ

Овом методом одређује се минимална температура унутрашње површине кућишта која доводи до паљења гаса, испарења или течности убризганих у кућиште.

1.5. КРИТЕРИЈУМИ КВАЛИТЕТА

Поновљивост се мења у зависности од опсега температура самозапаљења и коришћене методе испитивања.

Осетљивост и специфичност зависе од коришћене методе испитивања.

1.6. ОПИС МЕТОДЕ

1.6.1. Апаратура

Апаратура је описана у методама датим у одељку 1.6.3. ове методе.

1.6.2. Услови испитивања

Узорак испитиване супстанце испитује се у складу са методама датим у одељку 1.6.3. ове методе.

1.6.3. Поступак испитивања

Видети стандард SRPS EN 60079-20-11:2011, Експлозивне атмосфере – Део 20-1: Класификација материјалних карактеристика гасова и пара – Методе испитивања и подаци.

2. ПОДАЦИ

Бележи се температура испитивања, атмосферски притисак, количина коришћеног узорка и време до појаве паљења.

3. ИЗВЕШТАВАЊЕ

Извештај о испитивању, уколико је могуће, садржи:

– прецизан опис супстанце (идентификацију и нечистоће);

– количину коришћеног узорка и атмосферски притисак;

– коришћену апаратуру;

– резултате мерења (температуре испитивања, резултате који се односе на паљење, одговарајуће време до појаве паљења);

– све додатне напомене релевантне за тумачење резултата.

А.16. РЕЛАТИВНА ТЕМПЕРАТУРА САМОЗАПАЉЕЊА (ЗА ЧВРСТЕ СУПСТАНЦЕ)

1. МЕТОДА ИСПИТИВАЊА

1.1. УВОД

Овом методом се не испитују експлозивне супстанце и супстанце које се спонтано пале у контакту са ваздухом на собној температури.

Сврха испитивања јесте добијање прелиминарних података о самозапаљивости чврстих супстанци на повишеним температурама.

Уколико се топлота која се ослобађа у реакцији супстанце са кисеоником или при егзотермном разлагању не одаје довољно брзо у околину, долази до њеног самозагревања које доводи до самозапаљења. Самозапаљење се јавља када је брзина ослобађања топлоте већа од брзине одавања топлоте.

Овај поступак испитивања користан је за прелиминарно скрининг испитивање чврстих супстанци. С обзиром на сложену природу паљења и сагоревања чврстих супстанци, температура самозапаљења одређена овом методом користити се само за потребе поређења.

1.2. ДЕФИНИЦИЈЕ И МЕРНЕ ЈЕДИНИЦЕ

Температура самозапаљења одређена овом методом представља минималну температуру околине изражену у степенима Целзијуса (°C) при којој се одређена запремина супстанце запали под дефинисаним условима.

1.3. РЕФЕРЕНТНЕ СУПСТАНЦЕ

Нису прописане.

1.4. ПРИНЦИП МЕТОДЕ

Одређена запремина супстанце која се испитује ставља се у пећ на собној температури. Бележи се крива односа времена и температуре у центру узорка док се температура у пећи подиже до 400° C или до тачке топљења уколико је нижа од поменуте, брзином 0,5° C/min.

За потребе овог испитивања, температура самозапаљења јесте температура пећи при којој температура узорка достиже 400° C самозагревањем.

1.5. КРИТЕРИЈУМИ КВАЛИТЕТА

Нису прописани.

1.6. ОПИС МЕТОДЕ

1.6.1. Апаратура

1.6.1.1. Пећ

Лабораторијска пећ са могућношћу програмирања температуре (запремине око 2 литра), са природном циркулацијом ваздуха и испустом за случај експлозије. Ради избегавања потенцијалног ризика од експлозије, не сме се дозволити да гасови настали разлагањем дођу у додир са електричним грејним елементима.

1.6.1.2. Коцка од жичане мреже

Парче жичане мреже од нерђајућег челика са отворима од 0,045 mm исече се према шаблону датом на Слици 1. Мрежа се испресавија и осигура жицом у облик коцке са отвором на врху.

1.6.1.3. Термоелементи

Одговарајући термопар.

1.6.1.4. Записивање резултата

Било који двоканални систем за записивање калибрисан од 0° C до 600° C или на одговарајући напон.

1.6.2. Услови испитивања

Супстанце се испитују у облику у коме су примљене.

1.6.3. Поступак испитивања

Коцка се пуни супстанцом која се испитује. Супстанца се благо сабија и додаје док се коцка потпуно не попуни. Затим се коцка окачи у центар пећи на собној температури. Један термоелемент поставља се у центар коцке, а други између коцке и зида пећи да мери температуру у пећи.

Температуре пећи и узорка непрекидно се бележе док се температура у пећи повећава до 400° C или до тачке топљења уколико је нижа, брзином 0,5° C/min.

Када дође до паљења супстанце, термоелемент који се налази у узорку показује веома оштар пораст температуре у односу на температуру у пећи.

2. ПОДАЦИ

Температура пећи при којој температура узорка достиже 400° C самозагревањем јесте температура релевантна за процену (видети Слику 2).

3. ИЗВЕШТАВАЊЕ

Извештај о испитивању, уколико је могуће, садржи:

- опис супстанце која се испитује;

– резултате мерења укључујући и криву температура/време;

– све додатне напомене важне за тумачење резултата.

4. ЛИТЕРАТУРА

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

Слика 1. Шема коцке (20 mm) за испитивање

Слика 2

Крива температура - време

А.17. ОКСИДУЈУЋА СВОЈСТВА (ЗА ЧВРСТЕ СУПСТАНЦЕ)

1. МЕТОДА ИСПИТИВАЊА

1.1. УВОД

Пре него што се приступи испитивању корисно је имати податке о потенцијалним експлозивним својствима супстанце.

Ова метода се не примењује на течности, гасове, експлозивне или лако запаљиве супстанце и органске пероксиде.

Ово испитивање се не спроводи када се на основу структурне формуле довољно поуздано може утврдити да супстанца не може да развије егзотермну реакцију у контакту са запаљивим материјалом.

Потребно је извршити прелиминарна испитивања ради провере да ли испитивање треба вршити под посебним условима.

1.2. ДЕФИНИЦИЈЕ И МЕРНЕ ЈЕДИНИЦЕ

Време горења јесте време реакције, изражено у секундама, потребно да се зона реакције прошири кроз супстанцу према поступку описаном у одељку 1.6. ове методе.

Брзина горења изражава се у милиметрима по секунди.

Максимална брзина горења јесте највиша вредност брзине горења добијена испитивањем смеша које садрже 10% до 90% (масених) оксидујућег средства.

1.3. РЕФЕРЕНТНА СУПСТАНЦА

Баријум-нитрат (аналитичке чистоће) користи се као референтна супстанца при испитивању и при прелиминарном испитивању.

Референтна смеша јесте смеша баријум-нитрата са спрашеном целулозом (обично смеша са 60% (масених) баријум-нитрата), припремљена према упутствима из одељка 1.6. ове методе, која има максималну брзину горења.

1.4. ПРИНЦИПИ МЕТОДЕ

Прелиминарно испитивање врши се из безбедносних разлога. Када прелиминарно испитивање јасно покаже да испитивана супстанца има оксидујућа својства нема потребе за даљим испитивањима. У супротном врши се потпуни поступак испитивања супстанце.

Код потпуног испитивања, супстанца која се испитује и дефинисана запаљива супстанца мешају се у различитим односима. Свака тако направљена смеша затим се обликује у гомилу. Гомила се на једном крају запали. Одређена максимална брзина горења затим се упоређује са максималном брзином горења референтне смеше.

1.5. КРИТЕРИЈУМИ КВАЛИТЕТА

Уколико је потребно, примењује се било која метода уситњавања и мешања, ако се максимална брзина горења у шест одвојених испитивања разликује од аритметичке средње вредности за највише 10%.

1.6. ОПИС МЕТОДЕ

1.6.1. Припрема

1.6.1.1. Испитивана супстанца

Узорак за испитивање уситнити до честица величине < 0,125 mm на следећи начин: просејати испитивану супстанцу, део који се задржао на ситу самлети, па поновити овај поступак тако да сва количина узорка прође кроз сито.

Користи се било која метода млевења и просејавања која задовољава критеријуме квалитета.

Пре него што се припреми смеша, супстанца се суши на 105° C, до постизања константне масе. Уколико је температура разлагања супстанце нижа од 105° C, она се суши на одговарајућој нижој температури.

1.6.1.2. Запаљива супстанца

Као запаљива супстанца користи се целулоза у праху. У овим испитивањима користи се тип целулозе која се користи у хроматографији на танком слоју или у колонској хроматографији. Као најподеснија показала се целулоза код које 85% влакана има дужину између 0,020 mm и 0,075 mm. Целулозни прах пушта се кроз сито са отворима величине 0,125 mm. Иста серија целулозе користи се све време испитивања.

Пре него што се припреми смеша, целулозни прах се суши на температури од 105° C до постизања константне масе.

Уколико се при прелиминарном испитивању користи дрвено брашно, припрема се брашно од меког дрвета на тај начин што се сакупи део који пролази кроз сито отвора величине 1,6 mm, промеша, затим суши на температури од 105° C четири сата у слоју дебљине мање од 25 mm. Брашно се охлади и чува у херметички затвореној посуди, напуњеној количином потребном за испитивање, ако је могуће у року од 24 сата од сушења.

1.6.1.3. Иницијатор паљења

Као иницијатор паљења користи се врео пламен из гасног горионика (минималног пречника 5 mm). Уколико се користи други иницијатор паљења (нпр. када се испитивање врши у инертној атмосфери), у извештају се описује извор и објашњава због чега се користи.

1.6.2. Поступак испитивања

Напомена: Смеше оксидујућих средстава са целулозом или дрвеним брашном сматрају се потенцијално експлозивним материјама и њима се пажљиво рукује.

1.6.2.1. Прелиминарно испитивање

Осушена супстанца добро се измеша са осушеном целулозом или дрвеним брашном у односу два тежинска дела испитиване супстанце према једном тежинском делу целулозе или дрвеног брашна. Смеша се обликује у малу гомилу купастог облика димензија 3,5 cm (пречник основе) x 2,5 cm (висина) тако што се испуни посуда у облику купе, без сабијања (нпр. лабораторијски стаклени левак чија је цев запушена).

Гомила се поставља на хладно, незапаљиво, непорозно равно постоље које слабо проводи топлоту. Испитивање се изводи у дигестору као што је описано у одељку 1.6.2.2. ове методе.

Иницијатор паљења доводи се у контакт са купом. Прате се и бележе интензитет и трајање реакције.

Ако је реакција бурна супстанца се сматра оксидујућом.

У случају добијања сумњивих резултата, потребно је извршити целу серију испитивања.

1.6.2.2. Серија испитивања

Припремити смеше целулозе са оксидујућом супстанцом. Смеше садрже од 10 до 90 масених процената оксидујуће супстанце са кораком повећања 10%. У граничним случајевима користе се средње смеше оксидујуће супстанце са целулозом како би се прецизније добила максимална брзина горења.

Гомила се прави уз помоћ калупа. Калуп је сачињен од метала, дужине 250 mm, са троугластим попречним пресеком, унутрашње висине 10 mm, а ширине 20 mm. Са обе стране калупа, уздужно, постављају се два метална граничника који прелазе 2 mm изнад горње ивице троугластог попречног пресека (видети Слику). Ова посуда се напуни са већом количином смеше. Након што се калуп баци са висине од 2 cm на чврсту подлогу, преостали вишак супстанце уклони се помоћу косо постављене плоче.

Бочни граничници се уклоне, а остатак прашкасте материје поравна се помоћу ваљка.

Незапаљиво, непорозно постоље која слабо проводи топлоту затим се поставља на врх калупа, цела апаратура се обрне, а калуп се уклони.

Овако формирана гомила ставља се у дигестор.

Брзина ваздуха треба да буде довољна да се избегне ширење дима по лабораторији и не треба да се мења у току испитивања. Око апаратуре се подиже заштита од промаје.

С обзиром да су целулоза, као и неке супстанце које се испитују хигроскопне, испитивање се врши што је брже могуће.

Запалити један део гомиле уз помоћ пламена.

Мерити време трајања реакције на дужини од 200 mm, након што се зона реакције прошири 30 mm од иницијалне тачке.

Испитивање се врши са референтном супстанцом и најмање по једном са сваком од смеша испитиване супстанце са целулозом.

Уколико је максимална брзина горења знатно већа од брзине горења референтне смеше, испитивање се може обуставити. У супротном, испитивање се понавља пет пута са сваком од три смеше које имају највеће брзине горења.

Уколико се посумња у веродостојност позитивног резултата, испитивање се понавља са инертном супстанцом са сличном величином честица, као што је дијатомејска земља, уместо целулозе. Друга могућност је испитивање смеше која садржи целулозу и која има највећу брзину горења, у инертној атмосфери (садржај кисеоника < 2% v/v).

2. ПОДАЦИ

Из безбедносних разлога карактеристичним оксидујућим својством испитиване супстанце сматра се максимална брзина горења, а не њена средња вредност.

Вредност релевантна за процену јесте највећа добијена вредност брзине горења од шест испитивања одређене смеше.

Нацртати график зависности највеће вредности брзине горења од концентрације оксидујуће супстанце.

Максимална брзина горења очитава се са графика.

Шест измерених вредности брзине горења које се односе на смешу са највећом брзином горења не смеју да се разликују од аритметичке средње вредности за више од 10%. У супротном, побољшавају се методе уситњавања и мешања супстанце.

Упоредити максималне брзине горења испитиване и референтне смеше (видети одељак 1.3. ове методе).

Уколико се испитивања спроводе у инертној атмосфери, максимална брзина реакције пореди се са брзином реакције референтне смеше измерене у инертној атмосфери.

3. ИЗВЕШТАВАЊЕ

3.1. ИЗВЕШТАЈ О ИСПИТИВАЊУ

Извештај о испитивању, уколико је могуће, садржи податке о:

– идентитету, саставу, степену чистоће, садржају влаге испитиване супстанце;

– обради узорка за испитивање (нпр. млевење, сушење и др.);

– иницијатору паљења коришћен при испитивању;

– резултатима мерења;

– начину реакције (нпр. блесак и горење по површини, горење целе масе, податке о производима сагоревања, итд.);

– свим примедбама значајним за тумачење резултата, укључујући и опис интензитета реакције (пламен, варнице, дим, слабо тињање, итд.) и приближну дужину трајања која је добијена при прелиминарном испитивању из безбедносних разлога/ скрининг испитивања за испитивану и референтну супстанцу;

– резултатима испитивања са инертном супстанцом, ако постоје;

– резултатима испитивања спроведених у инертној атмосфери, ако постоје.

3.2. ТУМАЧЕЊЕ РЕЗУЛТАТА

Супстанца се сматра оксидујућом када:

а) при прелиминарном испитивању дође до снажне реакције;

б) при потпуном испитивању, максимална брзина горења испитиване смеше је већа или једнака максималној брзини горења референтне смеше целулозе и баријум-нитрата.

Да се избегну лажни позитивни резултати, узимају се у обзир и резултати добијени испитивањем супстанце у смеши са неким инертном материјалом и/или када се испитује у инертној атмосфери.

4. ЛИТЕРАТУРА

NF T 20-035 (September 85) Chemical products for industrial use. Determination of the oxidising properties of solids

Слика: Калуп и прибор за припрему гомиле (све димензије дате су у милиметрима)

А.18. СРЕДЊЕ МОЛЕКУЛСКЕ МАСЕ И РАСПОДЕЛА МОЛЕКУЛСКИХ МАСА ПОЛИМЕРА

Део први

1. МЕТОДА ИСПИТИВАЊА

Описана метода гел пропусне хроматографије заснива се на Упутству за испитивање OECD 118 (1996). Основни принципи методе и детаљне техничке информације дате су у литератури[1].

1.1. УВОД

Полимери имају различита својства. Из наведеног разлога немогуће је дати једну методу која поставља прецизне услове за раздвајање и процену и која покрива све могућности и све специфичности раздвајања полимера. Ово посебно важи за сложене полимерне системе на које се често не може применити гел пропусна хроматографија (Gel permeation chromatography, у даљем тексту: GPC). Када није могуће применити GPC молекулска маса се одређује применом других метода (видети Део други ове методе). У таквим случајевима, описују се сви детаљи и наводе разлози због којих се користи друга метода.

Метода која је описана заснива се на стандарду SRPS ISO 13885[1]. У овом стандарду дате су детаљне информације о

извођењу експеримената и евалуацији добијених података. Када је неопходно изменити експерименталне услове, ове измене се оправдавају. Користе се и други стандарди уколико имају референце. Узорци полистирена, чија је полудисперзивност позната, користе се за калибрацију према овој методи. Метода се може изменити како би одговарала одређеним полимерима, нпр. полимерима растворним у води и дуголанчаним разгранатим полимерима.

1.2. ДЕФИНИЦИЈЕ

Средња молекулска маса по бројној заступљености (у даљем тексту: M_n) и средња молекулска маса по масеној заступљености (у даљем тексту: M_w) одређују се на основу једначина:

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

при чему:

H_i јесте ниво детекторског сигнала од базне линије за ретенциону запремину V_i;

M_i јесте молекулска маса фракције полимера при ретенционој запремини V_i;

n јесте број релевантних података.

Опсег расподеле молекулске масе који представља меру дисперзије система дат је кроз однос M_w / M_n.

1.3. РЕФЕРЕНТНЕ СУПСТАНЦЕ

GPC је релативна метода, па се врши калибрација. За калибрацију се најчешће користе стандарди линеарног полистирена са познатим просечним молекулским масама M_n и M_w и са познатом уском дистрибуцијом молекулске масе. Калибрациона крива користи се само при одређивању молекулске масе непознатог узорка уколико су услови за раздвајање узорка и стандарда изабрани на идентичан начин.

Одређени однос молекулске масе и запремине елуата валидан је једино под дефинисаним условима одређеног експеримента. Наведени услови обухватају, пре свега, температуру, растварач (смешу растварача), услове хроматографије и колону за раздвајање или систем колона за раздвајање.

Молекулске масе узорка одређене на овај начин јесу релативне вредности и називају се: „молекулске масе еквивалентне полистирену". Ово значи да у зависности од структурних и хемијских разлика између узорка и стандарда, молекулске масе могу одступати од апсолутних вредности у већем или мањем степену. Уколико се користе други стандарди, нпр. поли(етиленгликол), поли(етилен-оксид), поли(метил-метакрилат), полиакрилна киселина, наводе се разлози за ово коришћење.

1.4. ПРИНЦИПИ МЕТОДЕ

Расподеле молекулске масе узорка и средње молекулске масе (M_n, M_w) одређују се применом GPC. GPC је посебан тип течне хроматографије којом се узорак одваја на основу хидродинамичких запремина појединачних састојака.[2]

Раздвајање се постиже тако што узорак пролази кроз колону испуњену порозним материјалом, најчешће неким органским гелом. Мали молекули могу да прођу кроз поре док велики молекули не могу. Пут који пролазе велики молекули је краћи и они први излазе са колоне. Молекули средње величине пролазе кроз неке од пора и елуирају се касније. Најмањи молекули, са просечним хидродинамичким пречником мањим од пора гела, могу ући у све поре и они се елуирају последњи.

У идеалним условима, на раздвајање утиче једино величина молекула, али у пракси је тешко избећи утицај апсорпционих ефеката.

Неуједначена паковања колона и мртве запремине могу да погоршају ситуацију[2].

Супстанце се детектују помоћу индекса рефракције или УВ апсорпцијом и на тај начин се добија проста крива расподеле. Да би се одредиле стварне вредности молекулских маса, неопходно је калибрисати колону пропуштањем полимера чије су молекулске масе познате и, идеално, таквих структура које су сличне са структурама многих других полимера, као нпр. различити стандарди полистирена. Најчешћи резултат је Гаусова крива, која је понекад деформисана малим репом на страни где се налазе вредности малих молекулских маса. Вертикална оса означава количину, према маси, честица различитих молекулских маса које су елуиране, а хоризонтална оса означава логаритам молекулске масе.

1.5. КРИТЕРИЈУМИ КВАЛИТЕТА

Поновљивост (Релативна стандардна девијација, у даљем тексту: РСД) елуиране запремине треба да буде боља од 0,3%. Захтевана поновљивост анализа обезбеђује се корекцијом интерним стандардом ако се хроматограм процењује на основу времена задржавања и ако не одговара наведеном критеријуму[1]. Полидисперзивност зависи од молекулских маса стандарда. Типичне вредности за полистиренске стандарде су:

$M_p < 2000$ $M_w/M_n < 1,20$

$2000 < M_p < 10^6$ $M_w/M_n < 1,05$

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

при чему:

M_p јесте молекулска маса стандарда на максимуму пика.

1.6. ОПИС МЕТОДЕ

1.6.1. Припрема стандардних раствора полистирена

Стандарди полистирена растварају се пажљивим мешањем у изабраном елуенту. При припремању раствора узимају се у обзир препоруке произвођача.

Концентрације изабраних стандарда зависе од различитих фактора, нпр. запремине која се ињектује, вискозитета раствора и осетљивости детектора. Максимална запремина која се ињектује прилагођава се дужини колоне, да се избегне преоптерећење. Типичне вредности запремина које се ињектују при аналитичким раздвајањима помоћу GPC за колоне димензија 30 cm x 7,8 mm крећу се између 40 ml и 100 ml. Користе се и веће запремине, али оне не треба да пређу вредност од 250 ml. Оптимални однос између ињектоване запремине и концентрације одређује се пре калибрације колоне.

1.6.2. Припрема раствора узорка

На припрему раствора узорака примењују се исти захтеви као и за стандардне растворе. Узорак се пажљивим мућкањем раствара у одговарајућем растварачу, нпр. тетрахидрофурану (у даљем тексту: THF). Коришћење ултразвучне каде за растварање не препоручује се. Када је неопходно, раствор узорка се пречишћава помоћу мембранског филтера величине пора између 0,2 mm и 2 mm.

Присуство нерастворних честица наводи се у завршном извештају јер се оне могу појавити услед присуства честица велике молекулске масе. За одређивање масеног процента нерастворних честица примењује се одговарајућа метода. Раствори се користе у року од 24 сата.

1.6.3. Апаратура

Апаратуру чине:

– посуда за растварач;

– уређај за дегазирање (ако је потребан);

– пумпа;

– пулсни пригушивач (ако је потребан);

– систем за ињектовање;

– хроматографске колоне;

– детектор;

– мерач протока (ако је потребан);

– процесор за прикупљање података;

– посуда за прикупљање отпада.

Потребно је обезбедити да GPC систем буде инертан према коришћеном растварачу (нпр. употреба челичних капилара за тетрахидрофуран).

1.6.4. Систем за ињектовање и увођење растварача

Одређена запремина раствора узорка уводи се у колону помоћу аутоматског уношења узорка или ручно у прецизно одређеној зони. Пребрзо повлачење или притискање клипа шприца, уколико се врши ручно, може довести до промена у испитиваној расподели молекулских маса. Систем за увођење растварача треба у највећој могућој мери да буде ослобођен од пулсирања, ако је могуће тако што ће садржати пулсни пригушивач. Брзина протока треба да буде у оквиру 1 ml/min.

1.6.5. Колона

У зависности од узорка, одређивање полимера врши се употребом или једне колоне или више међусобно повезаних колона у низу. Комерцијално су доступни бројни порозни материјали за колоне са дефинисаним својствима (нпр. величина пора, ексклузиони лимит – горња граница молекулске масе изнад које ће се молекули елуирати у ретенционој запремини). Избор гела за раздвајање или дужине колоне зависе од својстава узорка (хидродинамичке запремине, расподеле молекулске масе) и специфичних услова за раздвајање као што су: растварач, температура и брзина протока[1,2,3].

1.6.6. Теоријски подови

За колону или комбинацију колона које се користе за раздвајање одређује се број теоријских подова. То подразумева, у случају примене ТХФ-а као растварача, наношење раствора етилбензена или друге одговарајуће неполарне растворене супстанце на колону познате дужине. Број теоријских подова одређује се помоћу једначине:

$$N = 554\left(\frac{V_e}{W_{1/2}}\right)^2 \qquad N = 16\left(\frac{V_e}{W}\right)^2$$

при чему:

N јесте број теоријских подова;

V_e јесте елуциона запремина на максимуму пика;

W јесте ширина пика на базној линији;

$W_{1/2}$ јесте ширина пика на половини висине.

1.6.7. Ефикасност раздвајања

Поред броја теоријских подова који квантитативно одређује ширину трака, важну улогу има и ефикасност раздвајања, која је одређена нагибом калибрационе криве. Ефикасност раздвајања колона добија се на основу односа:

$$\frac{V_{e,Mx} - V_{e,(10Mx)}}{\text{површина попречног пресека колоне}} \geq 6{,}0\left[\frac{cm^3}{cm^2}\right]$$

при чему:

$V_{e.Mx}$ јесте елуциона запремина полистирена молекулске масе M_x;

$V_{e\ (10Mx)}$ јесте елуциона запремина полистирена са десет пута већом молекулском масом.

Резолуција система дефинише се као:

$$R_{1,2} = 2 \times \frac{V_{e1} + V_{e2}}{W1 + W_2} \times \frac{1}{log_{10}\ M_2/M_1}$$

при чему,

V_{e1} и V_{e2} јесу елуционе запремине два стандарда полистирена на максимуму пика;

W_1 и W_2 јесте ширина пикова на базној линији;

M_1 и M_2 јесу молекулске масе на максимуму пика (треба да се разликују за фактор 10).

R-вредност за систем колона треба да буде већа од 1,7 (видети у литератури[4]).

1.6.8. Растварачи

Сви растварачи треба да буду високе чистоће (користи се ТХФ чистоће 99,5%). Посуда за растварач (уколико је неопходно у атмосфери инертног гаса) треба да буде довољна за калибрацију колоне и неколико анализа узорка. Растварач се дегазира пре него што се убаци у колону помоћу пумпе.

1.6.9. Контрола температуре

Температура критичних унутрашњих делова (петље за ињектовање, колоне, детектора и цеви) треба да буде константна и у складу са изабраним растварачем.

1.6.10. Детектор

Сврха детектора је да бележи концентрацију узорка елуираног са колоне. Да би се избегло непотребно ширење пикова, запремина кивете ћелије детектора треба да буде што је могуће мања. Она не сме бити већа од 10 ml, осим у случају детектора заснованих на расипању светлости и вискозности. За детекцију се најчешће користи диференцијална рефрактометрија. Уколико узорак или растварач имају нека посебна својства могу се користити и друге врсте детектора, као нпр. УВ/ВИС, ИЦ, детектор вискозности и сл.

2. ПОДАЦИ И ИЗВЕШТАВАЊЕ

2.1. ПОДАЦИ

Стандард SRPS ISO 13885[1] служи као литература за детаље о критеријумима за процену, као и у вези захтева за прикупљање и обраду података.

За сваки узорак се врше два независна експеримента. Они се одвојено анализирају.

M_n, M_w, M_w/M_n и M_p се дају за свако мерење. Неопходно је јасно назначити да измерене вредности представљају релативне вредности еквивалентне молекулским масама коришћених стандарда.

Након што се одреде ретенционе запремине или ретенциона времена (могу се кориговати помоћу интерних стандарда), на график се уцртавају ове вредности према логаритму M_p вредности (при чему је M_p максимум пика калибрационог стандарда). Потребне су најмање две тачке за калибрацију у декадном опсегу молекулских маса (1 kD–10 kD,

10 kD–100 kD, 100 kD–1.000 kD) и најмање пет мерних тачака за цео график које покривају распон очекиваних молекулских маса. Крајња тачка мале молекулске масе на калибрационој кривој дефинише се *п*-хексилбензеном или неким другим одговарајућим неполарним растварачем. Средње молекулске масе по бројној заступљености и по масеној заступљености одређују се електронском обрадом података на основу формула датих у одељку 1.2. ове методе, а могу се одређивати и ручно[XXVI]. Крива расподеле се даје у облику табеле или слике (диференцијална фреквенција или збир процентуалних износа према вредности log M). Код графичког приказа један декадни опсег молекулских маса треба да буде ширине око 4 cm, а максимална висина пика да износи 8 cm. У случају интеграљења криве расподеле размак ординате између 0% и 100% треба да буде око 10 cm.

––––––––––––––

XXVI Може се користити ASTM D 3536-91

2.2. ИЗВЕШТАЈ О ИСПИТИВАЊУ

Извештај о испитивању садржи податке о:

2.2.1. Испитиваној супстанци:

– познате податке о испитиваној супстанци (идентитет, адитиви, нечистоће);

– опис обраде узорка, запажања, проблеми.

2.2.2. Инструментима:

– посуда за растварач, инертни гас, дегазирање елуента, састав елуента, нечистоће;

– пумпа, пулсни пригушивач, систем за ињектовање;

– хроматографске колоне (произвођач, информације о карактеристикама колона као што су: величина пора, врста материјала за одвајање итд., број, дужина и редослед употребљених колона);

– број теоријских подова колоне (или комбинације), ефикасност раздвајања (резолуција система);

– податке о симетрији пикова;

– температура колона, начин контроле температуре;

– детектор (принцип мерења, врста, запремина кивете);

– мерач протока уколико је коришћен (произвођач, принцип мерења);

– систем за прикупљање и обраду података (хардвер, софтвер).

2.2.3. Калибрацији система:

– детаљан опис методе коришћене у изради калибрационе криве;

– податке о критеријумима квалитета који се односе на ову методу (нпр. коефицијент корелације, грешка методом најмањих квадрата, итд.);

– податке о свим примењеним екстраполацијама, претпоставкама и апроксимацијама приликом испитивања, процени и обради података;

– сва мерења коришћена при изради калибрационе криве се документују у виду табеле која садржи следеће податке за сваку калибрациону тачку:

(-) име узорка;

(-) име произвођача узорка;

(-) карактеристичне вредности стандарда M_p, M_n, M_w, M_w/M_n онако како их је доставио произвођач или које су изведене на основу додатних мерења, заједно са детаљима о методи њиховог одређивања;

(-) ињектовану запремину и ињектовану концентрацију узорка;

(-) M_p вредност која је коришћена за калибрацију;

(-) елуциону запремину или кориговано ретенционо време измерено на максимуму пика;

(-) M_p израчунато на максимуму пика;

(-) процентуалну грешку израчунате вредности M_p и калибрисане вредности.

2.2.4. Процени:

– процена на основу ретенционог времена: методе које се користе да би се обезбедила неопходна репродуктивност

(метода корекције, интерни стандарди, итд.);

– податак о томе да ли је евалуација извршена на основу елуционе запремине или на основу ретенционог времена;

– податке о границама процене ако пикови нису потпуно анализирани;

– опис методе поравнавања, уколико су коришћене;

– припрема и поступци претходне обраде узорка;

– присуство нерастворних честица, уколико су присутне;

– ињектована запремина (m1) и ињектована концентрација узорка(mg/ml);

– запажања која указују на ефекте који доводе до одступања од идеалног GPC профила;

– детаљан опис свих измена у поступку испитивања;

– детаљи о опсезима грешке;

– било које друге податке и запажања релевантни за тумачење резултата.

3. ЛИТЕРАТУРА

1. SRPS ISO 13885-1:2011, Пуниоци за боје и лакове – Гел пропустљива хроматографија – Део I: тетрахидрофуран као елуент

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.

Део други

ПРИМЕРИ ДРУГИХ МЕТОДА ЗА ОДРЕЂИВАЊЕ СРЕДЊЕ МОЛЕКУЛСКЕ МАСЕ ПО БРОЈНОЈ ЗАСТУПЉЕНОСТИ (M_n) ЗА ПОЛИМЕРЕ

Гел пропусна хроматографија (GPC) је препоручена метода (посебно када је доступан сет стандарда који има сличну структуру као и полимер) за одређивање вредности M_n. Када постоје практични проблеми који онемогућују употребу ове методе или ако се очекује да супстанца неће испунити M_n критеријуме (што треба да буде потврђено) могу се користити расположиве алтернативне методе, као што су:

1. УПОТРЕБА КОЛИГАТИВНИХ СВОЈСТАВА

1.1. Ебулиоскопија/криоскопија

Ова метода обухвата мерења повишења тачке кључања (ебулиоскопија) или снижење тачке мржњења (криоскопија) растварача када се дода полимер. Заснива се на чињеници да утицај раствореног полимера на тачку кључања/мржњења течности зависи од молекулске масе полимера[1,2]. Примењивост, за Mn < 20.000.

1.2. Снижење напона паре

Ова метода обухвата мерење напона паре изабране референтне течности пре и после додавања познатих количина полимера[1,2].

Примењивост за Mn < 20.000 (теоретски, у пракси лимитирана вредност).

1.3. Мембранска осмометрија

Ова метода се заснива на принципу осмозе, тј. природној тежњи молекула растварача да кроз полупропустљиву мембрану пређу из разблаженог у концентровани раствор да би се успоставила равнотежа. При испитивању, разблажени раствор има концентрацију нула, док концентровани раствор садржи полимер. Ефекат проласка растварача кроз мембрану доводи до разлике у притисцима што зависи од концентрације и молекулске масе полимера[1,3,4].

Примењивост, за Mn између 20.000 и 200.000.

1.4. Осмометрија парне фазе

Ова метода подразумева поређење брзине испаравања чистог аеросола растварача и најмање три аеросола који садрже полимер у различитим концентрацијама[1,5,6].

Примењивост за Mn < 20.000.

2. АНАЛИЗА ТЕРМИНАЛНИХ ГРУПА

Да би се користила ова метода потребно је познавање структуре полимера и врсте терминалних група у његовом ланцу (које се разликују од основног ланца нпр. помоћу нуклеарне магнетне резонанце (NMR) или титрације/дериватизације). Утврђивање молекулске концентрације група којима се завршава полимерни ланац користи се за утврђивања молекулске масе[7,8,9].

Примењивост за Mn до 50.000 (уз смањену поузданост).

3. ЛИТЕРАТУРА

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 Weightof 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, pp. 25-52.

5. ASTM 3592-77, (1977). Standard Recommended Practice for Determination of Molecular Weight byVapour Pressure, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

6. Morris, C.E.M., (1989). Vapour Pressure osmometry. In: Determinationn of Molecular Weight, A.R.Cooper ed., John Wiley and Sons.

7. 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.

А.19. САДРЖАЈ МОЛЕКУЛА СА МАЛИМ МОЛЕКУЛСКИМ МАСАМА У ПОЛИМЕРУ

Део први

1. МЕТОДА ИСПИТИВАЊА

Метода гел пропусне хроматографије заснива се на Упутству за испитивање OECD 119 (1996). Основни принципи методе и детаљније техничке информације дате су у литератури.

1.1. УВОД

Полимери имају различита својства. Због наведеног немогуће је дати једну методу која поставља прецизне услове за раздвајање и процену и која покрива све могућности и све специфичности које се јављају током раздвајања полимера.

Посебно важи за сложене полимерне системе на које се често не може применити гел пропусна хроматографија (Gel permeation chromatography, у даљем тексту: GPC). Када није могуће применити GPC молекулска маса се одређује применом других метода (видети Део други ове методе). У таквим случајевима описују се сви детаљи и наводе разлози због којих се користи друга метода.

Описана метода заснива се на Стандарду SRPS ISO 13885[1]. Детаљне информације о извођењу експеримента и начину процене добијених података дате су у наведеном стандарду. У случају да је неопходно извршити измену експерименталних услова, ове измене се оправдавају. Користе се и други стандарди уколико су потпуно наведени у литератури. Метода која је дата користи полистиренске узорке познате полидисперзивности за калибрацију, али се модификује, ако је неопходно, како би одговарала одређеним полимерима, нпр. полимерима растворним у води или дуголанчаним разгранатим полимерима.

1.2. ДЕФИНИЦИЈЕ

Молекули са малим молекулским масама јесу молекули са молекулском масом испод 1.000 далтона.

Средња молекулска маса по бројној заступљености M_n и средња молекулска маса по масеној заступљености M_w одређују се према једначинама:

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

при чему:

H_i јесте ниво сигнала детектора од базне линије за ретенциону запремину V_i;

M_i јесте молекулска маса фракције полимера при ретенционој запремини V_i;

n јесте број релевантних тачака.

Опсег расподеле молекулских маса који представља меру дисперзије система дат је кроз однос M_w/M_n.

1.3. РЕФЕРЕНТНЕ СУПСТАНЦЕ

GPC је релативна метода. Због наведеног се врши калибрација. За калибрацију се најчешће користе стандарди линеарног полистирена са познатим просечним молекулским масама M_n и M_w и са познатом уском дистрибуцијом молекулске масе. Калибрациона крива се користи само за одређивање молекулске масе непознатог узорка уколико су услови за раздвајање узорка и стандарда одабрани на идентичан начин.

Одређени однос молекулске масе и елуционе запремине валидан је само под специфичним условима одређеног експеримента. Ови услови обухватају, између осталог, температуру, растварач (или смешу растварача), услове хроматографије и колону за раздвајање или систем колона.

Молекулске масе узорка утврђене на овај начин јесу релативне вредности и називају се: „молекулске масе које одговарају полистирену". Наведено значи да у зависности од структурних и хемијских разлика између узорка и стандарда, молекулске масе могу да одступају од апсолутних вредности у мањој или већој мери. Уколико се користе други стандарди, нпр. поли(етиленгликол), поли(етиленоксид), поли(метил-метакрилат), полиакрилна киселина, наводе се и разлози за њихово коришћење.

1.4. ПРИНЦИП МЕТОДЕ

GPC методом одређује се расподела молекулске масе узорка и средње молекулске масе (M_n и M_w). GPC јесте посебна врста течне хроматографије код које се узорак раздваја на основу хидродинамичких запремина појединачних састојака[2].

Раздвајање се заснива на проласку узорка кроз колону испуњену неким порозним материјалом, обично неким органским гелом. Мањи молекули могу да уђу у поре док велики молекули пролазе без задржавања. Пут који пролазе већи молекули је краћи те они први силазе са колоне. Молекули средње величине улазе у неке од пора и они касније силазе са колоне. Најмањи молекули, са просечним хидродинамичким полупречником мањим од пора гела, могу да уђу у све поре. Стога они последњи силазе са колоне.

У идеалним условима на раздвајање утиче само величина молекула, али у пракси је тешко избећи утицај апсорпциопних ефеката. Неуједначена паковања колона и мртве запремине могу да погоршају ситуацију[2].

Детекција се врши помоћу индекса рефракције или УВ апсорпције, а резултат је проста крива расподеле. Да би се на криву унеле стварне молекулске масе неопходно је да колоне буду калибрисане тако што ће кроз њих проћи полимери чија је молекулска маса позната и, који у идеалним условима, имају сличну структуру као што су различити полистиренски стандарди. Најчешће се добија Гаусова крива, коју понекад нарушава мали реп на крају на коме се налазе мале молекулске масе. Вертикална оса криве представља количину, по тежини, елуираних молекула различитих маса, док хоризонтална оса представља логаритамску вредност молекулских маса.

Садржај молекула малих молекулских маса очитава се са наведене криве. Ово рачунско извођење је тачно само ако молекули различитих малих молекулских маса одговарају, на основу масе, полимеру као целини.

1.5. КРИТЕРИЈУМИ КВАЛИТЕТА

Поновљивост (Релативна стандардна девијација) елуционе запремине треба да буде већа од 0,3%. Захтевана поновљивост анализа обезбеђује се корекцијом интерним стандардом уколико се хроматограм процењује на основу ретенционих времена и не одговара наведеном критеријуму[1]. Полидисперзивност зависи од молекулских маса стандарда. Типичне вредности за полистиренске стандарде су:

$Mp < 2000$ $Mw/Mn < 1.20$

$2000 \leq Mp \leq 10^6$ $Mw/Mn < 1.05$

$Mp > 10^6$ $Mw/Mn < 1.20$

при чему:

M_p јесте молекулска маса стандарда на максимуму пика.

1.6. ОПИС МЕТОДЕ

1.6.1. Припрема стандардних раствора полистирена

Стандарди полистирена растварају се пажљивим мешањем у изабраном елуенту. При припремању раствора узимају се у обзир препоруке произвођача. Концентрације изабраних стандарда зависе од различитих фактора, нпр. запремине која се ињектује, вискозитета раствора и осетљивости аналитичког детектора. Максимална запремина која се ињектује прилагођена је дужини колоне, тако да се избегне преоптерећење.

Типичне запремине ињектирања за аналитичка раздвајања у методи гел пропусне хроматографије, са колонама димензија 30 cm x 7,8 mm, крећу се између 40 ml и 100 ml. Могуће су и веће запремине, али оне не би требало да прелазе 250 ml. Оптимални однос између ињектоване запремине и концентрације одређује се пре калибрације колона.

1.6.2. Припрема раствора узорка

На припрему раствора узорка примењују се исти захтеви као и за припрему стандардних раствора. Узорак се раствара у

одговарајућем растварачу, нпр. тетрахидрофурану (у даљем тексту: ТХФ), пажљивим мућкањем. Не препоручује се коришћење ултразвучне каде за растварање. Када је неопходно, раствор узорка се пречишћава помоћу мембранског филтера величине пора између 0,2 mm и 2 mm.

Присуство нерастворних честица наводи се у завршном извештају јер се оне могу појавити услед присуства честица велике молекулске масе. За одређивање масеног процента нерастворних честица примењује се одговарајућа метода. Раствори се користе у року од 24 h.

1.6.3. Корекција садржаја због присутних нечистоћа и адитива

Обично се врши корекција садржаја молекула чија је M < 1.000 због удела специфичних компоненти које нису полимери, а које су присутне у раствору (нпр. нечистоће и/или адитиви), изузев уколико измерени садржај није < 1%. Ово се постиже директним анализама раствора полимера или елуата. У случајевима када је елуент, након проласка кроз колону, превише разблажен да би се могао анализирати, он се концентрује. Некада треба елуент упарити до сувог, па затим поново растворити. Концентровање елуента се врши под таквим условима да се спече све могуће измене његовог састава. Обрада елуента добијеног методом гел пропусне хроматографије зависи од аналитичке методе која се користи за квантитативно одређивање.

1.6.4. Апаратура

GPC апаратура се састоји од:

– посуде за растварач;

– уређаја за дегазирање (када је неопходно);

– пумпе;

– пулсног пригушивача (када је неопходно);

– система за ињектовање;

– хроматографске колоне;

– детектора;

– мерача протока (када је неопходно);

– процесора за прикупљање података;

– посуде за прикупљање отпада.

Потребно је обезбедити да GPC систем буде инертан према коришћеном растварачу (нпр. употреба челичних капилара за ТХФ као растварач).

1.6.5. Систем за ињектовање и увођење растварача

Одређена запремина раствора узорка уводи се у колону помоћу аутоматског уношења узорка или ручно у прецизно одређеној зони. Пребрзо повлачење или притискање клипа шприца, уколико се врши ручно, може довести до промена у испитиваној расподели молекулске масе. Систем за увођење растварача треба, у највећој могућој мери, да буде ослобођен од пулсирања, ако је могуће тако што ће садржати пулсни пригушивач. Брзина протока треба да буде у оквиру 1 ml/min.

1.6.6. Колона

У зависности од узорка, одређивање полимера врши се употребом или једне колоне или више међусобно повезаних колона у низу. Комерцијално су доступни бројни порозни материјали за колоне са дефинисаним својствима (нпр. величина пора, ексклузиони лимит (горња граница молекулске масе изнад које ће се молекули елуирати у ретенционој запремини)) Избор гела за раздвајање или дужина колоне зависе од својстава узорка (хидродинамичке запремине, расподеле молекулске масе) и од специфичних услова за раздвајање као што су растварач, температура и брзина протока[1,2,3].

1.6.7. Теоријски подови

За колону или комбинацију колона које се користе за раздвајање одређује се број теоријских подова. То подразумева, у случају примене ТХФ као растварача, наношење раствора етил-бензена или неке друге одговарајуће неполарне супстанце на колону познате дужине. Број теоријских подова одређује се помоћу једначине:

$$N = 554\left(\frac{V_e}{W_{1/2}}\right)^2 \qquad N = 16\left(\frac{V_e}{w}\right)^2$$

при чему:

N јесте број теоријских подова;

V_e јесте елуциона запремина на максимуму пика;

W јесте ширина пика на базној линији;

$W_{½}$ јесте ширина пика на половини висине.

1.6.8. Ефикасност раздвајања

Поред броја теоријских подова који квантитативно одређује ширину трака, важну улогу има ефикасност раздвајања која је одређена нагибом калибрационе криве. Ефикасност раздвајања колоне добија се на основу односа:

$$\frac{V_{e,Mx} - V_{e,(10Mx)}}{\text{површина попречног пресека колоне}} \geq 6{,}0 \left[\frac{cm^3}{cm^2}\right]$$

при чему:

$V_{e.Mx}$ јесте елуциона запремина полистирена молекулске масе M_x;

$V_{e(10Mx)}$ јесте елуциона запремина полистирена са десет пута већом молекулском масом.

Резолуција система дефинише се као:

$$R_{1,2} = 2 \times \frac{V_{e1} + V_{e2}}{W1 + W_2} \times \frac{1}{log_{10} M_2 / M_1}$$

при чему:

V_{e1} и V_{e2} јесу елуционе запремине два полистиренска стандарда на максимуму пика;

W_1 и W_2 јесу ширине пикова на базној линији;

M_1 и M_2 јесу молекулске масе на максимуму пика (треба да се разликују за фактор 10).

R-вредност за систем колона треба да буде већа од 1,7[4].

1.6.9. Растварачи

Сви растварачи треба да буду високе чистоће (користи се ТХФ чистоће 99,5%). Посуда за растварач (уколико је неопходно у атмосфери инертног гаса) треба да буде довољна за калибрацију колоне и неколико анализа узорка.

Растварач се дегазира пре него што се убаци у колону уз помоћ пумпе.

1.6.10. Контрола температуре

Температура критичних унутрашњих делова (петље за ињектовање, колоне, детектор и цеви) треба да буде константна и у складу са изабраним растварачем.

1.6.11. Детектор

Сврха детектора је да бележи концентрацију узорка елуираног са колоне. Да би се избегло непотребно ширење пикова, запремина кивете ћелије детектора треба да буде што је могуће мања. Она не сме да буде већа од 10 ml осим у случају детектора заснованих на расипању светлости и вискозности. За детекцију се најчешће користи диференцијална рефрактометрија. Уколико узорак или растварач имају нека посебна својства, могу се користити и други типови детектора, нпр. УВ/ВИС, ИЦ, детектори вискозности и др.

2. ПОДАЦИ

Стандард SRPS ISO 13885[1] служи као литература за детаље о критеријумима за процену као и у вези захтева који се односе на прикупљање и обраду података.

За сваки узорак се врше два независна експеримента. Они се одвојено анализирају. У свим случајевима важно је извршити испитивање слепе пробе под истим условима као и узорак.

Неопходно је јасно назначити да су измерене вредности релативне вредности еквивалентне молекулским масама коришћених стандарда.

Након што се одреде ретенционе запремине или ретенциона времена (могу се кориговати помоћу интерних стандарда) на график се уцртавају ове вредности према логаритму M_p вредности (при чему је M_p максимум пика калибрационог стандарда). Потребне су најмање две калибрационе тачке у декадном опсегу молекулских маса (1 kD–10 kD, 10 kD–100 kD, 100 kD–1.000 kD) и најмање пет мерних тачака за цео график које покривају распон очекиваних молекулских маса. Завршна тачка малих молекулских маса која се налази на крају калибрационе криве дефинише се помоћу n-хексилбензена или неког другог одговарајућег неполарног растварача. Део криве који одговара молекулским масама испод 1.000 kD одређује се и коригује ако је потребно због садржаја нечистоћа и адитива. Подаци са криве елуирања углавном се обрађују електронски, али се могу вршити и ручна израчунавања[XXVII]. Уколико се у колони задржао неки од нерастворних полимера, његова молекулска маса је вероватно већа од оне коју има растворна фракција, и уколико се занемари може доћи до лоше процене садржаја молекула са малим молекулским масама.

Упутство за кориговање садржаја молекула са малим молекулским масама код нерастворних полимера дато је у Делу другом ове методе.

Крива расподеле се даје у облику табеле или слике (диференцијална фреквенција или збир износа у процентима према вредности log M). Код графичког приказа један декадни опсег молекулских маса треба да буде ширине око 4 cm, а максимална висина пика да износи 8 cm. У случају интеграљења криве расподеле размак ординате између 0% и 100% треба да буде око 10 cm.

_____

XXVII Користи се ASTM D 3536-91

3. ИЗВЕШТАЈ О ИСПИТИВАЊУ

Извештај о испитивању садржи податке о:

2.2.1. Испитиваној супстанци:

– познате податке о испитиваној супстанци (идентитет, адитиви, нечистоће);

– опис обраде узорка, запажања проблеми.

2.2.2. Инструментима:

– посуда за растварач, инертни гас, дегазирање елуента, састав елуента, нечистоће;

– пумпа, пулсни пригушивач, систем за ињектовање;

– хроматографске колоне (произвођач, информације о карактеристикама колона, као што су величина пора, врста материјала за одвајање итд., број, дужина и редослед употребљених колона);

– број теоријских подова колоне (или комбинације), ефикасност раздвајања (резолуција система),

– податке о симетрији пикова;

– температура колона, начин контроле температуре;

– детектор (принцип мерења, врста, запремина кивете);

– мерач протока уколико је коришћен (произвођач, принцип мерења);

– систем за прикупљање и обраду података (хардвер и софтвер).

2.2.3. Калибрацији система:

– детаљан опис методе коришћене у изради калибрационе криве;

– податке о критеријумима квалитета који се односе на ову методу (нпр. коефицијент корелације, грешка методом најмањих квадрата, итд.);

– податке о свим примењеним екстраполацијама, претпоставкама и апроксомацијама приликом испитивања, процени и обради података;

– сва мерења коришћена при изради калибрационе криве се документују у виду табеле која садржи следеће податке за сваку калибрациону тачку:

(-) име узорка;

(-) име произвођача узорка;

(-) карактеристичне вредности стандарда M_p, M_n, M_w, M_w/M_n, онако како их је доставио произвођач или које су изведене на основу додатних мерења заједно са детаљима о методи њиховог одређивања;

(-) ињектована запремина и ињектована концентрација узорка;

(-) M_p вредност која је коришћена за калибрацију;

(-) елуциона запремина или кориговано ретенционо време измерено на максимуму пика;

(-) M_p израчунато на максимуму пика;

(-) процентуална грешка израчунате вредности M_p и калибрисане вредности.

2.2.4. Садржају молекула са малим молекулским масама:

– опис коришћене методе и начин на који су извршени експерименти;

– податке о проценту молекула са малим молекулским масама (m/m) у односу на цео узорак;

– податке о нечистоћама, адитивима и другим врстама које нису полимери изражене као масени проценат у односу на цео узорак.

2.2.5. Процени:

– процена на основу ретенционог времена: све методе које обезбеђују захтевану репродуктивност (метода корекције, интерни стандарди и др.);

– податак о томе да ли је процена извршена на основу елуционе запремине или на основу ретенционог времена;

– податке о ограничањима процене ако пикови нису потпуно анализирани;

– опис методе поравнавања, уколико су коришћене;

– припрема и претходна обрада узорка;

– присуство нерастворних честица, уколико их има;

– ињектована запремина (m1) и концентрација ињектованог узорка (mg/ml);

– запажања која се односе на утицаје који доводе до одступања од идеалног профила гел пропусне хроматографије;

– детаљан опис свих измена поступка испитивања;

– детаље о опсезима грешке;

– друге податке и запажања релевантне за тумачење резултата.

4. ЛИТЕРАТУРА

1. SRPS ISO 13885-1:2011, Пуниоци за боје и лакове – Гел пропустљива хроматографија – Део I: тетрахидрофуран као елуент

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 MolecularWeight 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 MolecularWeight Distribution of Polystyrene by High Performance Size-Exclusion Chromatography. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

Део други

УПУТСТВО ЗА КОРИГОВАЊЕ САДРЖАЈА МОЛЕКУЛА СА МАЛИМ МОЛЕКУЛСКИМ МАСАМА ЗБОГ ПРИСУСТВА НЕРАСТВОРНИХ ПОЛИМЕРА

Када је у узорку присутан нерастворни полимер долази до губитка масе у току GPC анализе. Нерастворни полимер иреверзибилно се задржава на колони или филтеру док његов растворни део пролази кроз колону. У случају када се може измерити или претпоставити повећање индекса рефракције (dn/dc) полимера, могуће је проценити губитак масе узорка на колони. У том случају врши се корекција коришћењем екстерне калибрације са стандардним материјалима познате концентрације и dn/dc да би се калибрисао одговор рефрактометра. У примеру који следи коришћен је стандард поли(метил-метакрилата) (pMMA).

Код екстерне калибрације у анализи акрилних полимера, pMMA стандард познате концентрације у тетрахидрофурану анализира се гел пропусном хроматографијом, а добијени резултати користе се за израчунавање константе рефрактометра на основу једначине:

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

при чему:

K јесте константна рефрактометра (у микроволтима / секунд/ml);

R јесте одговор pMMA стандарда/ (у микроволтима / секунд);

C јесте концентрација pMMA стандарда (у mg/ml);

V јесте ињектована запремину (у ml);

dn/dc јесте увећање индекса рефракције за pMMA у тетрахидрофурану (у ml/mg).

За pMMA стандард типичне вредности су:

R = 2 937 891

C = 1.07 mg/ml

V = 0,1 ml

$dn/dc = 9 \times 10^{-5}$ ml /mg

На овај начин добијена вредност K, 3.05 x 10^{11} користи се да се израчуна теоријски одговор детектора уколико је 100% инјектованог полимера издвојено преко детектора.

А.20. ПОНАШАЊЕ ПОЛИМЕРА У ВОДИ (РАСТВОРЉИВОСТ/ЕКСТРАКТИВНОСТ)

1. МЕТОДА ИСПИТИВАЊА

Ова метода заснива се на ревидираној верзији Упутства за испитивање OECD 120 (1997). Детаљније техничке информације дате су у литератури[1].

1.1. УВОД

За поједине полимере, као што су емулзиони полимери, да би се користила ова метода потребна је претходна припрема. Метода се не примењује на течне полимере нити на полимере који реагују са водом при условима испитивања.

Када испитивање овом методом није могуће или није практично за извођење, понашање растворљивости/екстрактивности испитује се другим методама. У таквим случајевима наводе се сви детаљи и разлози коришћења тих метода.

1.2. РЕФЕРЕНТНЕ СУПСТАНЦЕ

Нису прописане.

1.3. ПРИНЦИП МЕТОДЕ

Понашање полимера у воденој средини растворљивост/екстрактивност одређује се применом методе стакленог суда (видети методу А.6. Растворљивост у води, метода стакленог суда, која је дата у овом прилогу) са изменама које су дате у овој методи.

1.4. КРИТЕРИЈУМИ КВАЛИТЕТА

Нису прописани.

1.5. ОПИС МЕТОДЕ

1.5.1. Опрема

За ову методу неопходно је:

– уређај за млевење, тј. млин за производњу честица познатих величина;

– апарат за мешање са могућношћу контролисања температуре;

– мембрански систем за филтрирање;

– одговарајућа аналитичка опрема;

– стандардизована сита.

1.5.2. Припрема узорка

Репрезентативни узорак се прво помоћу одговарајућих сита сведе на честице величине од 0,125 mm до 0,25 mm. Некада је потребно охладити узорак због његове стабилности или процеса млевења. Гумасти материјали могу се уситнити на температури течног азота[1].

Ако није могуће добити честице тражених величина, материјал се уситњава што је више могуће, а постигнут резултат наводи се у извештају. У извештају се наводи начин на који је самлевени узорак чуван пре испитивања.

1.5.3. Поступак испитивања

Три узорка по 10 g супстанце која се испитује одмери се у сваку од три посуде са стакленим запушачима и дода 1.000 ml воде у сваку посуду. Ако се количина од 10 g полимера покаже неподесном, користи се следећа највећа количина са којом се може радити. Количину воде прилагођава се у складу са тим.

Посуде се чврсто запуше и затим мућкају на 20° C. Користе се уређаји за мућкање или мешање који могу да раде на константној температури. Након 24 часа, садржај сваке посуде се центрифугира или филтрира, а концентрација полимера у бистром воденом слоју одређује се одговарајућом аналитичком методом.

Ако не постоје одговарајуће аналитичке методе за одређивање полимера у воденој фази, укупна растворљивост – екстрактивност процењује се из масе осушеног талога са филтера или осушеног талога добијеног центрифугирањем.

Најчешће је потребно да се направи квантитативна разлика између нечистоћа и адитива са једне стране, и полимера са малим молекулским масама са друге стране. У случају гравиметријског одређивања важно је испитати слепу пробу у којој испитивана супстанца није присутна, како би се израчунао талог који настаје у експерименталном поступку.

Растворљивост/екстрактивност – понашање полимера у води на 37° C на pH 2 и pH 9 одређује се на исти начин као што је описано за експеримент на 20° C. pH вредности постижу се додавањем или одговарајућих пуфера, или одговарајућих киселина или база као што су хлороводонична киселина, сирћетна киселина, натријум или калијум хидроксид аналитичке чистоће или NH_3.

У зависности од примењене методе анализе, врши се једно или два испитивања. Када постоји довољно специфичних метода за директну анализу полимера у воденој фази, довољно је једно испитивање. Када наведене методе не постоје и када је одређивање понашања полимера растворљивости/екстрактивности ограничено на индиректне анализе којима се одређује само укупни садржај органског угљеника (Total organic carbon, у даљем тексту: TOC) воденог екстракта, врше се и додатна испитивања. Додатно испитивање се врши на три узорка, користећи десет пута мање количине узорка полимера и исте количине воде као у првом испитивању.

1.5.4. Анализа

1.5.4.1. Испитивање извршено са једном количином узорка

Постоје методе за директну анализу компоненти полимера у воденом екстракту. Алтернативно се разматра индиректна анализа растворених/екстрахованих компоненти полимера одређивањем укупног садржаја растворних компоненти коригованог за неполимерне компоненте.

Анализа укупног садржаја полимерних врста у воденом екстракту изводи се:

1) или довољно осетљивом методом односно:

– TOC користећи дигестију персулфатом или дихроматом за превођење у CO_2 који се одређује инфрацрвеном спектрометријом (у даљем тексту: IR) или хемијском анализом;

– Атомска апсорпциона спектрометрија (у даљем тексту: AAS) или индуктивно куплована плазма (у даљем тексту: ICP), емисиони еквивалент за полимере који садрже метале или силицијум;

– UV апсорпција или спектрофлуориметрија за арил-полимере;

– LC-MS за узорке мале молекулске масе;

2) или испаравањем у вакууму до сувог воденог екстракта и спектроскопском (IR, UV итд.) или AAS/ICP анализом талога.

Ако се анализа воденог екстракта као таква не може применити, водени екстракт се екстрахује органским растварачем који се не меша са водом, тј. хлорованим угљоводоником. Растварач се затим упари и талог анализира како је описано да би се одредио садржај полимера. Свака компонента у овом талогу која је идентификована као нечистоћа или адитив одузима се у циљу одређивања степена растворљивости/екстрактивности самог полимера.

Када су присутне релативно велике количине таквог материјала талог се анализира нпр. HPLC или GC анализом да би се разликовале нечистоће од мономера и присутних врста насталих од мономера, тако да се одреди прави садржај онога што је настало.

У неким случајевима је довољно једноставно испаравање органског растварача до сувог и мерење сувог остатка.

1.5.4.2. Испитивање извршено са две различите количине узорка

Сви екстракти талога анализирају се на TOC.

Нерастворни/неекстраховани део узорка одређује се гравиметријски. Уколико, након центрифугирања или филтрирања садржаја сваке посуде, талог полимера остане залепљен за зид посуде, посуда се испира филтратом све док се не пребаци сав талог. Након тога, филтрат се опет центрифугира или филтрира. Талог који остане на филтеру или у кивети центрифуге суши се на 40°C у вакууму и мери се. Сушење се наставља до константне масе.

2. ПОДАЦИ

2.1. ИСПИТИВАЊЕ ЈЕДНЕ КОЛИЧИНЕ УЗОРКА

Наводе се појединачни резултати за сваку од три боце и њихова средња вредност изражена у јединицама масе по запремини раствора (уобичајено mg/L) или јединицама масе по маси узорка полимера (уобичајено mg/g).

Наводи се и губитак масе узорка (израчунат као маса растворене супстанце подељена са масом почетног узорка). Рачунају се релативне стандардне девијације (РСД). Наводе се појединачне цифре за укупну супстанцу (полимер + главни адитиви итд.) и само за полимер (тј. након одузимања доприноса адитива).

2.2. ИСПИТИВАЊЕ ДВЕ РАЗЛИЧИТЕ КОЛИЧИНЕ УЗОРКА

Појединачне TOC вредности водених екстракта из два експеримента при којима су вршена по три испитивања и средња вредност за сваки експеримент, изражавају се као јединице масе по запремини раствора (уобичајено mgC/L), као и у јединицама масе по маси почетног узорка (уобичајено mgC/g).

Уколико не постоји разлика између резултата добијених са већим и мањим односом вода/узорак, ово може да указује на то да су све компоненте које могу да се екстрахују заиста и биле екстраховане. У том случају, директна анализа није потребна.

Наводе се појединачне масе талога и изражавају у процентима од почетних маса узорка. Средње вредности рачунају се за сваки експеримент. Разлике између 100% и нађених процената представљају проценат растворног материјала и материјала који се екстрахује у оригиналном узорку.

3. ИЗВЕШТАВАЊЕ

3.1. ИЗВЕШТАЈ О ИСПИТИВАЊУ

Извештај о испитивању садржи податке о:

3.1.1. Супстанци која се испитује:

– доступне податке о испитиваној супстанци (идентитет, адитиви, нечистоће, садржај молекула малих молекулских маса).

3.1.2. Експерименталним условима:

– опис поступака и експерименталних услова;

– опис аналитичких метода и метода детекције.

3.1.3. Резултатима:

– резултати растворљивости/екстрактивности у mg/l; појединачне и средње вредности екстраховања различитим растварачима, раздвојене на садржај полимера и нечистоћа, адитива, итд;

– резултати растворљивости/екстрактивности у mg/g полимера;

– TOC вредности водених екстракта, масе растворене супстанце и израчунате проценте, ако су мерене;

– pH сваког узорка;

– податке о вредностима слепих проба;

– када је потребно, напомене о хемијској нестабилности испитиване супстанце, током поступка испитивања и аналитичког поступка;

– све податке који су важни за тумачење резултата.

4. ЛИТЕРАТУРА

1. DIN 53733 (1976) Zerkleinerung von Kunststofferzeugnissen für Prüfzwecke

А.21. ОКСИДУЈУЋА СВОЈСТВА (ЗА ТЕЧНОСТИ)

1. МЕТОДА ИСПИТИВАЊА

1.1. УВОД

Ова метода осмишљена је за мерење потенцијала течних супстанци да повећају и развију брзину или интензитет горења запаљивих супстанци, или да направе смешу са запаљивом супстанцом која има способност спонтаног паљења, када се оваква смеша добро измеша. Заснива се на УН методи испитивања течности са оксидујућим својствима[1]. Метода А.21. осмишљена је тако да пре свега испуњава захтеве Уредбе Европског парламента и Савета (ЕЗ) број 1907/2006, па је потребно извршити поређење са једном референтном супстанцом. Испитивање и поређење са додатним референтним супстанцама је потребно у случају када се очекује да ће резултати испитивања бити коришћени у друге сврхе[XXVIII].

Испитивање се не мора вршити када је на основу структурне формуле поуздано јасно да супстанца нема способност да егзотермно реагује са запаљивим материјалом.

Пре него што се приступи испитивању корисно је имати прелиминарне податке о потенцијалним експлозивним својствима супстанце.

Ово испитивање се не примењује на супстанце у чврстом стању, гасове, експлозиве или високо запаљиве супстанце или органске пероксиде.

Када постоје резултати за испитивану супстанцу у УН методама испитивања за оксидујуће течности[1] није неопходно извршити њено испитивање.

_____

XXVIII Као на пример у оквиру прописа УН о транспорту.

1.2. ДЕФИНИЦИЈЕ

Време пораста притиска јесте просечна вредност измереног времена које је потребно да се притисак смеше која се испитује подигне са 690 kPa на 2.070 kPa изнад атмосферског притиска.

1.3. РЕФЕРЕНТНА СУПСТАНЦА

Као референтна супстанца користи се 65% (m/m) водени раствор азотне киселине (аналитичке чистоће)[XXIX].

Уколико лице које врши испитивање сматра да се резултати овог испитивања могу користити и у неке друге сврхе[1], постоји могућност да се испитају и додатне референтне супстанце[XXX].

_____

XXIX Киселина се титрује пре испитивања како би се потврдила њена концентрација.

XXX Нпр: 50% (m/m) перхлорна киселина и 40% (m/m) натријум-хлорат се користе у литератури[1].

1.4. ПРИНЦИП МЕТОДЕ

Течност која се испитује меша се у масеном односу један према један са влакнастом целулозом и ставља се у суд под притиском. Уколико током мешања или пуњења посуде дође до спонтаног паљења, није потребно даље испитивање.

Уколико не дође до спонтаног паљења спроводи се комплетно испитивање. Смеша се загрева у посуди под притиском и одређује се време које је потребно да се притисак повећа са 690 kPa на 2.070 kPa (изнад атмосферског притиска). Ова вредност се упоређује са просечном вредношћу времена пораста притиска референтне супстанце у смеши са целулозом у односу 1:1.

1.5. КРИТЕРИЈУМИ КВАЛИТЕТА

У серији од пет испитивања једне супстанце резултати појединачних испитивања не треба да одступају за више од 30% у односу на аритметичку средњу вредност. Резултати који одступају више од 30% од средње вредности одбацују се, побољшава се поступак мешања супстанци и пуњења посуде за испитивање и затим се испитивање понавља.

1.6. ОПИС МЕТОДЕ

1.6.1. Припрема

1.6.1.1. Запаљиве супстанце

Осушена влакнаста целулоза са влакнима дужине између 50 µm и 250 µm и средњим пречником од 25µm[XXXI] користи се као запаљиви материјал. Целулоза се суши до константне масе у слоју чија дебљина не прелази 25 mm на температури од 105° C током 4 сата и држи се у ексикатору без средства за сушење док се не охлади и даље до испитивања. Садржај воде у осушеној целулози не треба да буде већи од 0,5% по јединици суве масе[XXXII]. Уколико је потребно, време сушења се продужава[XXXIII]. Иста шаржа целулозе користи се у току целог испитивања.

_____

XXXI Нпр. Ватман колонска хроматографија целулозни прах CF 11, каталошки број 4021 050

XXXII Потврђена нпр. Карл-Фишеровом титрацијом

XXXIII Овај садржај воде се постиже и нпр. загревањем на 105°C у вакуму 24 часа.

1.6.1.2. Опрема

1.6.1.2.1. Суд под притиском

Захтева се коришћење суда под притиском. Овај суд се састоји од цилиндричног тела израђеног од челика, дужине 89 mm и спољног пречника од 60 mm (видети Слику 1). Две супротне стране машински су обрађене (чиме се попречни пресек посуде смањује на 50 mm) да би се олакшало навијање запушача на коме се налази систем за паљење и вентил одушка. Суд, који има шупљину пречника 20 mm, изнутра се своди на дубину од 19 mm и нарезује се да прими 1″ по Британском стандардном систему или величину еквивалентну овој према метричком систему. Вентил за одушак, у облику ручке која се монтира на бочну страну апарата, заврне се за криву површину суда под притиском на

удаљености од 35 mm од једног од његових крајева и под углом од 90° у односу на прирубнице. Издуби се отвор дубине 12 mm и нареже тако да прими величину од 1/2″ по Британском стандардном систему (или величину еквиваленту овој према метричком систему) на крају бочне стране. По потреби користи се инертни заптивач како би суд био непропустан за гасове. Ручка која се налази са стране протеже се 55 mm од тела суда под притиском и има навој од 6 mm. Крај ове ручке има навој који омогућава да у њега стане претварач притиска са дијафрагмом. Користи се било који уређај за мерење притиска ако није у контакту са врелим гасовима или производима разлагања и ако може да издржи пораст притиска од 690 kPa до 2.070 kPa у времену које није веће од 5 ms.

Крај суда под притиском који је на већој удаљености од ове ручке затвара се запушачем на коме се налази систем за паљење опремљен са две електроде, од којих је једна изолована у односу на тело заптивача а друга уземљена на њега. Други крај суда под притиском затвара се сигурносним диском који штити од експлозије (притисак експлозије око 2.200 kPa) који је причвршћен поклопцем за заптивање са отвором од 20 mm. Ако је потребно користи се инертни заптивач како би суд био непропустан за гасове. Сталак (висети Слику 2) држи апаратуру у одговарајућем положају у току употребе. Састоји се од основе израђене од меког челика димензија 235 mm x 184 mm x 6 mm и шупљег четвртастог профила дужине 185 mm и димензија 70 mm x 70 mm x 4 mm.

Са једне стране четвртастог профила изрежу се по дужини две супротне странице тако да се добије конструкција са две ноге равних страница са висином кућишта од 86 mm. Крајеви ових ногу равних страница секу се под углом од 60° по хоризонталној равни да би се заварили за ослонац. Жлеб ширине 22 mm и дубине 46 mm монтира се на једну страну кућишта суда тако да када се суд спусти на ослонац запушач на коме се налази систем за паљење буде окренут према изолаторској кутији, а ручка која је монтирана са стране упада у овај жлеб. Комад челика ширине 30 mm и дебљине 6 mm вари се за доњу унутрашњу страну изолаторске кутије да би одржавао растојање. Два шрафа од 7 mm који се пришрафљују са супротне стране држе суд под притиском чврсто на свом месту. Две траке од челика ширине 12 mm и дебљине 6 mm заварене са доње стране где се саставни делови додирују са изолаторском кутијом, обезбеђују суд под притиском одоздо.

1.6.1.2.2. Систем за паљење

Систем за паљење састоји се од жичаног проводника дужине 25 cm израђеног од Ni/Cr, чији је пречник 0,6 mm и отпорност 3,85 Ω/m. Жица је навијена на шипку пречника 5 mm, у облику калема и причвршћена је за електроде запушача на коме се налази систем за паљење. Овај калем има један од облика који су приказани на Слици 3. Размак између дна суда и доње стране проводника помоћу кога се пали смеша је 20 mm. Уколико се електроде не могу подешавати, крајеви проводника помоћу кога се пали смеша и дна посуде треба да буду изоловани керамичком облогом. Проводник се загрева сталним извором струје од најмање 10 A.

1.6.2. Поступак испитивања[XXXIV]

Апаратура, спојена са претварачем притиска и системом за паљење, али без сигурносног диска који штити од експлозије, налази се на подлози при чему је запушач са системом за паљење у доњој позицији. У стакленој чаши се помеша 2,5 g течности која се испитује са 2,5 g осушене целулозе помоћу стакленог штапића[XXXV]. Из безбедносних разлога, приликом мешања лице које рукује смешом се штити сигурносним штитом. Уколико смеша почне да гори током мешања или стављања у посуду за испитивање, испитивање се не мора спровести до краја. Смеша се додаје у малим количинама у суд под притиском уз сабијање. Води се рачуна да смеша буде постављена око проводника помоћу кога се врши паљење смеше и да контакт између смеше и проводника буде добар. Важно је да се проводник не искриви током процеса наношења смеше јер то може довести до погрешних резултата[XXXVI]. Сигурносни диск који штити од експлозије ставља се у одговарајућу позицију и причвршћује поклопцем за заптивање. Напуњен суд поставља се на сталак тако да се сигурносни диск који штити од експлозије налази на врху, а апарат се поставља у дигестор или у јединицу за испитивање запаљивих материја. Извор струје причврсти се за спољне клеме запушача са системом за паљење и пусти се струја јачине 10 A. Време између припреме смеше за испитивање и укључивања струје не треба да буде дуже од 10 минута.

Сигнал који долази са претварача притиска бележи одговарајући систем који истовремено бележи податке о развоју притиска током времена и анализира их (нпр. програм за бележење података добијених током испитивања повезан са програмом за израду графикона). Смеша се загрева све док не пукне сигурносни диск који штити од експлозије или најмање 60 s. Уколико се сигурносни диск који штити од експлозије не распрсне, смеша се оставља да се охлади пре него што се апарат пажљиво растави, водећи рачуна да може доћи до појаве надпритиска. Изводи се по пет испитивања са супстанцом која се испитује и са супстанцом која служи као референтна супстанца. Бележи се време које је потребно да притисак од 690 kPa порасте до притиска од 2.070 kPa. Израчунава се средња вредност времена које протекне до пораста притиска.

Може се догодити да супстанца доводи до пораста притиска (пребрзо или преспоро) услед хемијских реакција које нису карактеристичне за оксидујућа својства. Тада може бити потребно да се понови испитивање са неком инертном супстанцом, нпр дијатомејском земљом, уместо са целулозом, како би се утврдила природа реакције.

_____

XXXIV Смеше оксидујућих супстанци са целулозом потенцијално су експлозивне и са њима се пажљиво рукује.

XXXV У пракси се постиже припремањем смеше течности која се испитује и целулозе у односу 1:1 у већој количини од оне која је потребна за испитивање и пребацивањем 5 ± 0,1 g у посуду под притиском. Смеша се свеже припрема за свако испитивање.

XXXVI Контакт између суседних намотаја се избегава.

2. ПОДАЦИ

Времена пораста притиска испитиване супстанце и референтних супстанци.

Времена пораста притиска инертне супстанце уколико је такво испитивање спроведено.

2.1. ОБРАДА РЕЗУЛТАТА

Израчунава се просечно време пораста притиска за испитивану супстанцу и за референтне супстанце.

Израчунава се и просечно време пораста притиска за инертну супстанцу (уколико су испитивања извршена).

Примери резултата дати су у Табели 1.

Табела 1.

Примери резултата([a])

Супстанца([б])	Просечно време пораста притиска за смешу са целулозом 1:1 (ms)

Амонијум-дихромат, засићени водени раствор	20 800
Калцијум-нитрат, засићени водени раствор	6 700
Фери-нитрат, засићени водени раствор	4 133
Литијум-перхлорат, засићени водени раствор	1 686
Магнезијум-перхлорат, засићени водени раствор	777
Никал-нитрат, засићени водени раствор	6 250
Азотна киселина, 65%	4 767([ц])
Перхлорна киселина, 50%	121([ц])
Перхлорна киселина, 55%	59
Калијум нитрат, 30% водени раствор	26 690
Сребро-нитрат, засићени водени раствор	([д])
Натријум-хлорат, 40% водени раствор	2 555([ц])
Натријум-нитрат, 45% водени раствор	4 133
Инертна супстанца	
Вода: целулоза	([д])

([а]) Видети у литератури[1] за класификацију према транспортној шеми УН.

([б]) Засићени раствори треба да буду припремљени на 20° C.

([ц]) Средња вредност из међулабораторијских упоредних испитивања.

([д]) Максимални притисак од 2070 kPa није достигнут.

3. ИЗВЕШТАЈ

3.1. ИЗВЕШТАЈ О ИСПИТИВАЊУ

Извештај о испитивању садржи податке о:

– идентитету, саставу, чистоћи итд. податке о супстанци која се испитује;

– концентрацији испитиване супстанце;

– поступку сушења целулозе која је коришћена при испитивању;

– садржају воде у целулози која је коришћена при испитивању;

– резултатима мерења;

– резултатима испитивања са инертном супстанцом, ако постоје;

– израчунатом просечном времену пораста притиска;

– одступању од стандардног поступка испитивања и разлоге за то;

– свим додатним информацијама и примедбама значајним за тумачење резултата.

3.2. ТУМАЧЕЊЕ РЕЗУЛТАТА[XXXVII]

Резултати испитивања процењују се на основу:

а) чињенице да ли се смеша испитиване супстанце и целулозе спонтано пали и

б) поређењем просечних времена пораста притиска са вредности 690 kPa на притисак од 2.070 kPa испитиване супстанце и референтних супстанци

Течна супстанца сматра се оксидујућом супстанцом уколико:

а) се смеша испитиване супстанце и целулозе у масеном односу 1:1 спонтано пали или

б) смеша испитиване супстанце и целулозе у масеном односу 1:1 има просечно време повећања притиска мање или једнако смеши воденог раствора азотне киселине 65% (m/m) и целулозе у масеном односу 1:1.

Да би се избегао лажни позитивни резултат, приликом анализе добијених резултата узима се у разматрање и испитивање са инертним материјалом.

_____

XXXVII Видети у литератури[1] за тумачење резултата који су у оквиру УН прописа о транспорту за коришћење неколико референтних супстанци

4. ЛИТЕРАТУРА

1. Recommendations on the Transport of Dangerous Goods, Manual of Tests and Criteria. 3rd evised edition. UN Publication No: ST/SG/AC.10/11/Rev. 3, 1999, str. 342. Test O.2: Test for oxidising liquids.

При чему је:
А – Тело суда под притиском;
Б – Задржни вентил диска који штити од експлозије;
Ц – Задржни вентил за ватру;
Д – Заптивач од меког олова;
Е – Диск који штити од експлозије;
Ф – Ручка;
Г – Глава преносника притиска;
Х – Заптивач;
J – Изолована електрода;
К – Уземљена електрода;
Л – Изолација;
М – Челична купа;
Н – Искривљени жљеб заптивача.

Слика 2. Ослонац

Слика 3. Систем за паљење

При чему је:
А – Калем за паљење;
Б – Изолација;
Ц – Електроде;
Д – Заптивач за ватру.

Напомена: Може се користити било који од ових система.

А.22. ОДРЕЂИВАЊЕ СРЕДЊЕГ ГЕОМЕТРИЈСКОГ ПРЕЧНИКА ВЛАКАНА ПОМОЋУ ДУЖИНЕ

1. МЕТОДА ИСПИТИВАЊА

1.1. УВОД

У овој методи описује се поступак за мерење средњег геометријског пречника помоћу дужине (Length Weighted Geometric Mean Diameter, у даљем тексту: LWGMD) вештачких минералних влакана (Man Made Mineral Fibres, у даљем тексту: MMMF). Будући да се LWGMD влакана са 95% вероватноће налази између нивоа поузданости узорка од 95% (тј. LWGMD ± две стандардне грешке), вредност која се наводи у извештају (испитивана вредност) одговараће доњој граници поузданости узорка од 95% (тј. LWGMD – 2 стандардне грешке). Ова метода заснива се на ажурираној верзији (јун 1994. године) нацрта индустријског поступка за заштиту здравља, безбедност и заштиту животне средине (Health, Safety & Environment, HSE) који је

договорен на састанку између ECFIA (European Ceramic Fibres Industry Association) и HSE у Честеру 26. септембра 1993. године и који је израђен за потребе другог међулабораторијског експеримента и на основу тог експеримента[1,2]. Ова мерна метода може се користити за описивање пречника влакана супстанци у расутом стању или производа који садрже MMMF, укључујући ватростална керамичка влакна (refractory ceramic fibres, RCF), вештачка стаклена влакна (man-made vitreous fibres, MMVF), кристална и поликристална влакна.

Одређивање дужином је начин да се компензује утицај на расподелу пречника због пуцања дугачких влакана приликом узорковања или руковања материјалом. За мерење расподеле величина пречника MMMF користи се геометријска статистика (геометријска средина) будући да се њихове расподеле величина обично прибилижавају log-нормалној расподели.

Мерење дужине и пречника је заморан и дуготрајан посао, али ако се мере само влакна која додирују бесконачно танку црту у видном пољу скенирајућег електронског микроскопа (у даљем тексту: SEM), тада је вероватноћа да се одабере одређено влакно сразмерна дужини. Будући да је питање дужине за потребе одређивања дужином тиме решено, потребно је само измерити пречник и LWGMD-2SE се тада може израчунати на начин како је описано.

1.2. ДЕФИНИЦИЈЕ

Честица јесте предмет чији је однос дужине и ширине мањи од 3:1.

Влакно јесте предмет чији је однос дужине и ширине (однос страница) најмање 3:1.

1.3. ПОДРУЧЈЕ ПРИМЕНЕ И ОГРАНИЧЕЊА

Ова метода намењена је проучавању расподела пречника код средњих пречника од 0,5 µm до 6 µm. Већи пречници могу се мерити уз примену мањих повећања SEM, али се тиме повећавају ограничења метода код финијих расподела влакана, док се у случају средњих пречника испод 0,5 µm препоручује мерење уз помоћ трансмисиони електронски микроскоп (у даљем тексту: TEM).

1.4. ПРИНЦИП МЕТОДЕ ИСПИТИВАЊА

Узме се одређени број репрезентативних узорака из језгра мекане плоче или слободних влакана у расутом стању. Влакна у расутом стању се скрате дробљењем и репрезентативни подузорак диспергује у води. Аликвоти се екстрахују и филтрирају кроз поликарбонатни филтер величине пора 0,2 µm и припреме за преглед под скенирајућим електронским микроскопом (SEM). Пречници влакана мере се под увеличањем x 10.000 или већим методом пресецања линија да би се добила непристрасна процена средњег пречника. Израчуна се доњи интервал поузданости 95% (на основу једностраног испитивања) тако да се добије процена најниже вредности средњег геометријског пречника влакана материјала.

1.5. ОПИС МЕТОДЕ ИСПИТИВАЊА

1.5.1. Безбедност/мере опреза

Излагање људи влакнима у ваздуху треба свести на најмању могућу меру и код руковања сувим влакнима користити дигестор или комору за руковање са рукавицама.

Изложеност људи треба периодично проверавати како би се утврдила ефективност контролних метода. Код руковања MMMF влакнима треба носити рукавице за једнократну употребу како би се умањила иритација коже и спречила унакрсна контаминација.

1.5.2. Апаратура/опрема

– Преса и боје (да може да се произведе 10 MPa).

– Поликарбонатни филтери са капиларним порама величине пора 0,2 µm (пречник 25 mm).

– Мембрански филтер од целулозног естера величине пора 5 µm који се користи као помоћни филтер.

– Стаклени уређај за филтрацију (или филтрацијски системи за једнократну употребу) за филтере пречника 25 mm (нпр. стаклени комплет за микроанализу Millipore, тип XX10 025 00).

– Свеже дестилована вода, филтрирана кроз филтер величине пора 0,2 µm ради уклањања микроорганизама.

– Уређај за напаривање злата или злата/паладијума.

– Скенирајући електронски микроскоп резолуције до 10 nm и повећањем × 10.000.

– Разно: шпатуле, скалпелски нож тип 24, пинцета, цевчице SEM, карбонски лепак или карбонска лепљива трака, колоидно сребро.

– Ултразвучна сонда или стона ултразвучна купка.

– Бургија за узорковање језгра или бургија за плуту за узимање узорака из MMMF плоча.

1.5.3. Поступак испитивања

1.5.3.1. Узорковање

За узимање узорака из пресека тврдих или меканих влакнастих плоча користи се бургија за узорковање језгра или бургија за плуту од 25 mm. Узорци се узимају у једноликим размацима по ширини плоче, ако се ради о плочама мале дужине,

или насумично ако су расположиве велике плоче. Иста опрема може се користити и за екстракцију случајних узорака слободних влакана. По могућности треба узети шест узорака како би се узеле у обзир просторне варијације унутар материјала.

Шест језгрованих узорака издроби се у калупу пречника 50 mm под притиском од 10 MPa. Материјал се промеша шпатулом и поново компресује на 10 MPa. Материјал се затим извади из калупа и чува у запечаћеној стакленој боци.

1.5.3.2. Припрема узорка

Према потреби, влакно треба оставити око сат времена у пећи на температури од 450 °C да би се уклонило органско везиво.

Узорак се подели на подузорке поступком четвртања купе (то треба учинити у комори за заштиту од прашине).

Мала количина узорка (< 0,5 g) дода се шпатулом у 100 ml свеже дестиловане воде која је филтрирана кроз мембрански филтер 0,2 µm (могу се користити и други извори ултрачисте воде ако се покаже да су задовољавајућег квалитета). Узорак се добро распрши уз помоћ ултразвучне сонде снаге 100 W која је подешена тако да изазове кавитацију. (Ако сонда није расположива, користи се следећи поступак: узорак протрести и окренути, понављајући поступак 30 секунди; петоминутна обрада у ултразвучном купатилу; затим се протреса и окреће још 30 секунди.)

Чим се влакно диспергује, извади се одређени број аликвота (нпр. три аликвота од 3 ml, 6 ml и 10 ml) пипетом широког грла (запремине од 2 ml до 5 ml).

Сваки аликвот филтрира се под вакуумом кроз поликарбонатни филтер 0,2 µm и помоћни MEC филтер величине пора 5µm, користећи стаклени филтер – левак са цилиндричним судом. У левак се улије око 5 ml филтриране дестиловане воде и аликвот полако пипетира у воду држећи врх пипете испод мениска. Пипету и суд треба темељно испрати након пипетирања јер танка влакна имају тенденцију да се накупљају на површини.

Пажљиво уклонити филтер и одвојити га од помоћног филтера па ставити у посуду да се осуши.

Кружним покретом одсече се једна четвртина или једна половина дела филтера са филтерским талогом користећи скалпел типа 24. Одсечени део се пажљиво причврсти на носач SEM помоћу карбонске лепљиве траке или карбонског лепка. Колоидно сребро треба нанети на најмање три места како би се побољшао електрични контакт на крајевима филтера и носача. Када се лепак/колоидно сребро осуши, на површину талога се напаривањем нанесе око 50 nm злата или злато/паладијума.

1.5.3.3. Калибрација и рад SEM

1.5.3.3.1. Калибрација

Калибрацију SEM треба проверавати најмање једанпут недељно (у идеалном случају једанпут дневно) користећи серификовану решетку за калибрацију. Калибрација се проверава у односу на сертификовани стандард и ако измерена вредност (SEM) није у границама ± 2% одобрене вредности, калибрацију SEM треба прилагодити и поново проверити.

На стварној матрици узорка SEM има могућност резолуције бар минималног видљивог пречника од 0,2 µm, при увећању × 2.000.

1.5.3.3.2. Рад

SEM треба подесити на увећање од 10.000 и осигурати услове који дају добру резолуцију и прихватљив квалитет слике при малим брзинама скенирања, нпр. 5 секунди по сличици. Иако различити SEM могу имати различите радне поставке, за најбољу видљивост и резолуцију код рада са материјалима релативно ниске атомске масе углавном треба користити убрзавајући напон од 5 keV до 10 keV и уређај подесити на малу величину тачке и кратку радну удаљеност. Кад се спроводи линеарна путања треба користити нагиб од 0° да би се смањила потреба за поновним фокусирањем, а ако SEM има еуцентричну фазу, треба користити еуцентричну радну удаљеност. Може се користити и мање увећање ако материјал не садржи мала влакна (малог пречника) и пречници влакана су велики (> 5 µm).

1.5.3.4. Одређивање величине

1.5.3.4.1. Испитивање узорка прегледом при малом увећању

На почетку узорак треба прегледати под малим увећањем да би се откриле евентуалне назнаке згрушавања великих влакана и проценила густина влакана. У случају претераног згрушавања, препоручује се да се припреми нови узорак.

Да би се постигла статистичка тачност, потребно је измерити одређени минимални број влакана, а велика густина влакана може се сматрати пожељним својством јер испитивање празних поља одузима време, а не доприноси анализи. Међутим, ако је филтер преоптерећен, биће тешко измерити сва мерљива влакна, а нека мања влакна се могу и превидети ако су сакривена иза великих влакана.

Ако је густина влакана изнад 150 влакана по милиметру линеарне путање, може се јавити пристрасност у смислу превисоке процене LWGMD. С друге стране, мале концентрације влакана продужавају време анализе и често је исплативије припремити узорак чија је густина влакана ближа оптималној густини него наставити са бројањем на филтерима са ниском концентрацијом. Код оптималне густине влакана треба просечно да се добије отприлике једно до два бројива влакна по видном пољу при увећању од 5.000. Оптимална густина зависи од величине (пречника) влакана па испитивач у одређеној мери треба стручно да просуђује како би одлучио да ли је густина влакана приближно оптимална или није.

1.5.3.4.2. Одређивање пречника влакана дужином

Броје се само влакна која додирују (или секу) (бесконачно) танку црту на екрану SEM. Из тог разлога треба повући водоравну (или вертикалну) црту кроз средину екрана.

Друга могућност је да се у средини екрана стави једна тачка и започне континуирано скенирање у једном смеру преко филтера. Мери се и бележи пречник сваког влакна односа страница већег од 3:1 које додирује или сече ту тачку.

1.5.3.4.3. Одређивање величине влакна

Препоручује се да се измери најмање 300 влакана. Свако влакно мери се само једанпут у тачки где сече линију или тачку нацртану на слици (или у близини тачке пресека ако су ивице влакна скривене). Ако се наиђе на влакна неуједначеног пресека, узима се у обзир мерење које представља просечни пречник влакна. Дефинисање ивице и мерење најкраће удаљености између ивица влакна захтева посебан опрез. Одређивање величине може да се врши директно током рада или, на сачуваним сликама односно фотографијама. Препоручују се полуаутоматски системи мерења слике који податке учитавају директно у табелу, јер се тако штеди време и избегавају грешке у преписивању, а израчунавање се може аутоматизовати.

Крајеве дугачких влакана треба прегледати под малим увећањем да би се проверило да не завијају назад у видно поље мерења и да не би били измерени више пута.

2. ПОДАЦИ

2.1. ОБРАДА РЕЗУЛТАТА

Пречници влакана обично немају нормалну расподелу. Логаритамском трансформацијом може се добити приближно нормална расподела.

Израчуна се аритметичка средина (средњи lnD) и стандардна девијација (SD_{lnD}) вредности логаритма по бази е (lnD) n пречника влакана (D).

$$\text{средњи } lnD = \frac{\Sigma lnD}{n}$$

$$SD_{lnD} = \sqrt{\frac{\Sigma(lnD - \text{средњи } lnD)}{n-1}}$$

Стандардна девијација подели се са квадратним кореном броја мерења (n) да би се добила стандардна грешка (SE_{lnD}).

$$SD_{lnD} = \frac{SD}{\sqrt{n}}$$

Да би се добила геометријска средина умањена за две геометријске стандардне грешке, двострука стандардна грешка се одузме од средње вредности и израчуна експонент те вредности (средња вредност минус две стандардне грешке).

$$LWGMD - 2SE = e^{(\text{средњи } \ln(L) - 2SE_{\ln(L)})}$$

3. ИЗВЕШТАВАЊЕ

3.1. ИЗВЕШТАЈ О ИСПИТИВАЊУ

Извештај о испитивању нарочито садржи податке о:

– вредности LWGMD-2SE;

– свим одступањима, а посебно оним која могу да утичу на прецизност или тачност резултата, уз одговарајућа образложења.

4. ЛИТЕРАТУРА

1. B. Tylee SOP MF 240. Health and Safety Executive, February 1999. G. Burdett and G. Revell. Development of a standard method to measure the length-weigthed geometric mean fibre diameter: Results of the Second inter-laboratory exchange. IR/L/MF/94/07. Project R42.75 HPD. Health and Safety Executive, Research and Laboratory Services Division, 1994.

Прилог 2.

ОПШТИ УВОД

А. ОПИС СВОЈСТАВА ИСПИТИВАНЕ СУПСТАНЦЕ

Пре почетка студија токсичности потребно је знати састав испитиване супстанце укључујући и главне нечистоће и значајна физичка и хемијска својства укључујући стабилност.

Физичка и хемијска својства испитиване супстанце важни су подаци за избор пута примене, плана сваке појединачне студије, као и начина руковања и чувања испитиване супстанце.

Почетку студије претходи унапређивање аналитичке методе за квалитативну и квантитативну анализу испитиване

супстанце (укључујући главне нечистоће када потребно) у вехикулуму за примену дозе и биолошком материјалу.

У извештај о испитивању укључују се сви подаци које се односе на идентификацију, физичка и хемијска својства, чистоћу и понашање испитиване супстанце.

Б. БРИГА О ЖИВОТИЊАМА

При испитивању токсичности важна је строга контрола услова смештаја и техника о одговарајућој бризи о животињама.

а) Услови смештаја

Услови смештаја у просторијама и кавезима за експерименталне животиње одговарају експерименталној врсти која се користи. За пацове, мишеве и заморце одговарајући услови су: собна температура од 22 °C ± 3 °C са релативном влажношћу од 30% до 70%; а за куниће температура је 20 °C ± 3° C са релативном влажношћу од 30% до 70%.

Неке експерименталне технике нарочито су осетљиве на ефекте температуре и у тим случајевима детаљи одговарајућих услова укључени су у опис методе испитивања.

У свим истраживањима токсичних ефеката температура и влажност се прате, бележе и укључују у коначни извештај о испитивању.

Осветљење је вештачко са смењивањем 12 сати светла и 12 сати мрака. Детаљи о осветљености током експеримента бележе се и укључују у коначни извештај о испитивању.

Ако није другачије прописано у методи испитивања, животиње се могу сместити у одговарајући смештај за појединачно и одвојено држање или у кавезима у малим групама истог пола. У случају групног смештаја не стављан се више од пет животиња у кавез.

У извештају о испитивању на животињама важно је назначити тип кавеза и број животиња смештених у сваком кавезу за време излагања хемикалији и у сваком каснијем периоду посматрања.

б) Исхрана

Исхрана задовољава све нутритивне захтеве врсте која се користи у испитивању. Када се испитиване супстанце дају животињама преко хране, нутритивна вредност може да буде смањена услед међусобног утицаја супстанце и састојака хране. Могућност оваквог утицаја разматра се при тумачењу резултата испитивања. Може се употребити уобичајена лабораторијска храна са слободним приступом води за пиће. На избор хране може да утиче потреба да се обезбеди одговарајућа смеша уколико се испитивана супстанца даје преко хране.

Нечистоће у храни за које се зна да утичу на токсичност не би требало да су присутне у концентрацијама које утичу на резултате испитивања.

В. АЛТЕРНАТИВНА ИСПИТИВАЊА

Европска унија промовише развој и признавање алтернативних метода које могу да дају исти ниво информација као садашња испитивања на животињама, али које користе мање животиња, изазивају мање патње или избегавају употребу животиња.

Такве методе, када буду доступне, узимају се у обзир за карактеризацију опасности и класификацију која следи, као и за обележавање опасности и процену безбедности хемикалије кад год је то могуће.

Г. ПРОЦЕНА И ТУМАЧЕЊЕ

Када се испитивања процењују и тумаче, разматрају се ограничења директне екстраполације резултата испитивања на животињама и *in vitro* студија на човека, и зато се за потврду резултата испитивања могу, када су доступни, користити докази о штетним ефектима на људе.

Д. ЛИТЕРАТУРА

Већина ових метода развијена је у оквиру програма Организације за економски развој и сарадњу (у даљем тексту: OECD) и спроводе се у складу са принципима Добре лабораторијске праксе, да би се обезбедило шире „узајамно прихватање података".

Додатне информације могу се наћи у препорукама у OECD водичима и литератури.

B.1 *bis*. АКУТНА ОРАЛНА ТОКСИЧНОСТ – МЕТОДА ФИКСНИХ ДОЗА

Део први

1. МЕТОДА ИСПИТИВАЊА

Ова метода испитивања заснива се на Упутству за испитивање OECD 420 (2001).

1.1. УВОД

У традиционим методама за одређивање акутне токсичности одређене испитиване супстанце смрт животиња користи се као циљни показатељ испитивања токсичности (endpoint). Британско токсиколошко удружење предложило је 1984. године, на основу примене низа фиксних доза[1], нови приступ испитивања акутне токсичности. Овај приступ заснива се на посматрању

јасних знакова токсичности једног од низа фиксних дозних нивоа, како би се избегло угинуће животиња као циљни показатељ. Након *in vivo* валидираних испитивања (Велика Британија[2] и међународна[3]), поступак фиксних доза је 1992. године прихваћен као метода испитивања. Касније су статистички подаци поступка фиксних доза валидирани помоћу математичких модела у низу испитивања[4,5,6]. Заједно су *in vivo* испитивања и студије на моделима показале да је поступак репродуктиван, користи се мањи број животиња и у поређењу са традиционалним методама изазива мању патњу животиња, а рангира токсичност супстанце подједнако добро као и друге развијене методе испитивања акутне токсичности.

Упутства за избор најбоље методе испитивања за одређену намену могу се пронаћи у литератури[7] која садржи додатне информације о извођењу и тумачењу резултата добијених методом испитивања B.1 *bis*.

Принцип ове методе испитивања јесте да се у главном испитивању користе само умерено токсичне дозе, а избегавају потенцијално смртоносне дозе. Избегава се и примена оних доза за које је познато да услед појаве корозивног оштећења или јаке иритације изазивају значајан бол или стрес код животиња. Животиње које су на самрти или су јасно изложене интензивном болу или стресу, лишавају се живота на хуман начин, а у коначној обради резултата третирају се на исти начин као и животиње које угину за време испитивања. У посебном водичу[8] дати су критеријуми према којима се животиње које су на самрти или јако пате лишавају живота на хуман начин, а дефинисани су и симптоми на основу којих је лако препознати неминовну смрт.

Ова метода испитивања обезбеђује податке о опасним својствима супстанце и омогућава процену и класификацију према Глобално хармонизованом систему за класификацију и обележавање УН (у даљем тексту: ГХС) у односу на акутну токсичност[9].

Пре почетка студије узимају се у обзир сви доступни подаци о испитиваној супстанци. Подаци укључују идентитет и хемијску структуру супстанце; њена физичка и хемијска својства; резултате обављених *in vitro* или *in vivo* испитивања токсичности; токсиколошке податке о структурно сличним супстанцама; као и предвиђене начине коришћења супстанце. Ови подаци указују на важност извођења студије за заштиту здравља људи, а помажу и при избору одговарајуће почетне дозе.

1.2. ДЕФИНИЦИЈЕ

Акутна орална токсичност јесте својство хемикалије да изазове штетне ефекте након примене појединачне пероралне дозе или неколико пероралних доза у периоду од 24 сата.

Одложена смрт јесте угинуће животиња које не угину или нису животно угрожене током првих 48 сати, већ до угинућа долази у периоду посматрања од 14 дана.

Доза јесте количина примењене испитиване супстанце. Изражава се као маса испитиване супстанце по јединици телесне масе (ТМ) експерименталне животиње (mg/kg).

Евидентна токсичност јесте токсични ефекат код кога се јављају јасни знакови токсичности након примене испитиване супстанце (за примере видети у литератури[3]), који су толико интензивни да би излагање следећој већој фиксној дози код животиња вероватно довело до јаког бола, стреса, исцрпљености, стања на самрти (критеријуми су приказани у Водичу[8] или до смртног исхода).

ГХС јесте скраћеница за Глобално хармонизован систем за класификацију и обележавање хемикалија УН. Развој овог система је заједнички напор OECD, УН Комитета стручњака за транспорт опасног терета (физичка и хемијска својства) и Међународне организације рада (ILO), а координира га Међуорганизацијски програм за правилно управљање хемикалијама (IOMC).

Неминовна смрт јесте очекивана смрт животиње која је на самрти или се њена смрт очекује пре планираног наредног времена посматрања. Симптоми који указују на ово стање код глодара су конвулзије, латерални положај, лежећи положај или тремор (за детаље видети у литератури[8]).

LD_{50} (средња смртна доза) јесте статистички одређена појединачна доза супстанце за коју се очекује да изазива смртност код 50 посто испитиваних животиња када се примени пероралним путем. Вредност LD_{50} изражава се у јединици масе испитиване супстанце по јединици телесне масе експерименталне животиње (mg/kg).

Гранична доза јесте горња гранична доза која се користи у испитивању (2.000 mg/kg или 5.000 mg/kg).

Стање на самрти јесте стање дефинисано као немогућност преживљавања или неминовна смрт животиње, чак и након евентуалног третмана (за детаље видети у литератури[8]).

Предвидљива смрт јесте стање које карактерише присутност клиничких знакова који указују на неминовну смрт животиње пре завршетка експеримента, на пример немогућност узимања воде или хране (за детаље видети у литератури[8]).

1.3. ПРИНЦИП МЕТОДЕ

На групе животиња истог пола поступно се (корак по корак) примењују фиксне дозе од 5 mg/kg, 50 mg/kg, 300 mg/kg и 2.000 mg/kg (изузетно, може се размотрити и примена још једне фиксне дозе од 5.000 mg/kg, видети одељак 1.6.2 ове методе). Количина иницијалне дозе бира се на основу претходних испитивања. Примењује се она доза за коју се очекује да ће резултирати неким знаковима токсичности, при чему ова доза неће изазвати тешко тровање или смрт. Клинички знакови или стања која упућују на јак бол, патњу или неминовну смрт животиње детаљно су описани у посебном OECD Водичу[8]. Након примене иницијалне дозе групе животиња које се даље укључују у испитивање могу се дозирати већим или мањим фиксним дозама, у зависности од тога да ли су присутни знакови који указују на токсичност или угинуће. Овај поступак се наставља до примене дозе која изазива евидентну токсичност или смрт највише једне животиње. Поступак се прекида када највећа

примењена доза не изазове токсичне ефекте или када најнижа примењена доза доведе до смрти животиња.

1.4. ОПИС МЕТОДЕ

1.4.1. Избор животињске врсте

Препоручена врста глодара је пацов, иако се за испитивања користе и друге животињске врсте. Најчешће се користе женке[7], јер је на основу литературе која се односи на испитивање LD_{50} уочено да је мала разлика у осетљивости полова при примени ове методе. У случајевима у којима је уочена разлика, женке су показале нешто већу осетљивост[10]. Ако се у литератури пронађу токсиколошки или токсикокинетички подаци за структурно сличне хемикалије који указују на то да су мужјаци осетљивији на одређену испитивану супстанцу, користе се мужјаци за испитивање. Кад се испитивање изводи на мужјацима, наводи се оправданост за њихову примену.

Испитивање се изводи на здравим младим јединкама оних лабораторијских сојева који се уобичајено користе у оваквим испитивањима. Испитивање се врши на женкама које нису раније рађале и нису гравидне. Свака животиња, на почетку испитивања и примене првих доза испитиване супстанце, треба да буде стара између 8 и 12 недеља, а њена телесна маса треба да буде у опсегу ± 20% од средње вредности масе претходно дозираних животиња.

1.4.2. Услови смештаја и исхрана

Температура просторије у којој се држе животиње је 22º C (± 3º C). Релативна влажност ваздуха је најмање 30%, али не више од 70% (осим када се просторије чисте). Идеално је влажност ваздуха одржавати између 50% и 60%. Осветљење је вештачко, и то у интервалима од 12 сати светла и 12 сати мрака. За исхрану се може примењивати уобичајена храна за лабораторијске животиње, са слободним приступом води за пиће. Животиње се према примењеној дози испитиване супстанце могу груписати у кавезе. Број животиња по кавезу не сме ни на који начин да омета процес праћења и посматрања сваке животиње.

1.4.3. Припрема животиња

Животиње се бирају насумце, обележавају ради лакшег разликовања, а да би се прилагодиле на лабораторијске услове држе се у кавезима најмање пет дана пре почетка експеримента и примене прве дозе испитиване супстанце.

1.4.4. Припрема доза

Испитиване супстанце примењују се у константним запреминама, па је неопходно прилагођавање концентрације за припремање различитих доза. При испитивању хемикалије у течном стању, примена неразблажене испитиване супстанце, односно супстанце која је у смеши у константној концентрацији, може да буде значајна за каснију процену ризика од те супстанце. Максимална појединачна запремина дозе не сме да се прекорачи. Максимална запремина течности која сме да се примени зависи и од величине експерименте животиње. Запремина испитиване супстанце која се примењује код глодара не би смела да прелази 1 ml/100g ТМ животиње; а уколико се примењује водени раствор може се размотрити и доза од 2 ml/100g ТМ животиње. Кад је реч о формулацији и припреми дозе, првенствено се препоручује примена воденог раствора/суспензије/емулзије, а затим раствора/суспензије/емулзије у уљу (нпр. кукурузном уљу) или раствор у неком другом вехикулуму. За све вехикулуме осим воде неопходно је знати њихове токсиколошке карактеристике. Дозе се припремају непосредно пре примене, осим ако се ради о супстанци за коју је познато да је стабилна у раствору током дужег временског периода.

1.5. ПОСТУПАК

1.5.1. Примена доза

Испитивана супстанца примењује се у једној дози сондом директно у желудац или интубирањем канилом. У посебним околностима, када једнократна доза није могућа, испитивана супстанца може се применити у неколико мањих порција током временског периода који није дужи од 24 сата.

Пре почетка примене доза испитиване супстанце, потребно је изгладнети животиње (нпр. пацовима је потребно ускратити храну али не и воду преко ноћи; мишевима је потребно ускратити храну али не и воду на 3 до 4 сата). Након периода гладовања, потребно је измерити телесну масу животиња и применити испитивану супстанцу. Након прве дозе, храна може поновно да се ускрати, и то: код пацова наредних 3 до 4 сата, а код мишева наредна 1 до 2 сата. Када се доза испитиване супстанце примени у неколико мањих порција у одређеном временском интервалу, може да се укаже потреба за храном и водом уколико се ради о продуженом временском периоду.

1.5.2. Претходно испитивање

Циљ претходног испитивања животиња је одређивање одговарајуће почетне дозе за главно испитивање. Испитивана супстанца примењује се на појединачним животињама поступно као што је описано у дијаграму тока испитивања који је дат у Делу другом ове методе. Претходно испитивање је завршено када је могуће донети одлуку о почетној дози (или у случајевима када дође до угинућа већ код најниже фиксне дозе).

Почетна доза за претходно испитивање може да буде фиксни дозни ниво од 5 mg/kg, 50 mg/kg, 300 mg/kg и 2.000 mg/kg, а дефинисана је као она доза које ће изазвати јасне знакове токсичности, одабрана на основу података *in vivo* и *in vitro* испитивања за испитивану супстанцу или друге структурно сличне хемикалије. Уколико нема оваквих података, за почетну дозу узима се концентрација од 300 mg/kg.

Потребно је направити паузу од најмање 24 сата између примене доза испитиване супстанце код сваке појединачне животиње. Животиње је потребно посматрати кроз временски период од најмање 14 дана.

Изузетно, и само у случајевима кад то оправдавају специфичне потребе, може да се размотри примена још једне веће фиксне дозе од 5.000 mg/kg (видети Део четврти ове методе). Због добробити животиња, не препоручује се испитивање на животињама за класификацију испитиване супстанце у Категорију 5 према ГХС-у (у опсегу доза од 2.000 mg/kg до 5.000 mg/kg), и разматра се само у случајевима када постоји велика вероватноћа да ће резултати оваквог испитивања имати непосредан значај за заштиту здравља људи или животне средине.

У случајевима када у претходном испитивању већ код најниже примењене фиксне дозе (5 mg/kg) дође до смрти експериментне животиње, уобичајен поступак је да се испитивање заврши, а испитивана супстанца класификује у Категорију 1, према ГХС-у (као што се може видети у Делу другом ове методе). Уколико је потребна додатна потврда за овакву класификацију, може се спровести додатно испитивање и то тако што се друга животиња дозира са 5 mg/kg. Ако дође до смрти и друге животиње, сматра се потврђеном класификација у Категорију 1 према ГХС-у, и обустављају се сва даља испитивања. Ако друга животиња преживи, тада се на највише три додатне животиње примењује доза од 5 mg/kg. Због високог ризика од смртности, накнадно уведене животиње потребно је укључивати у експеримент једну по једну ради добробити животиња. Временски размак између дозирања код појединачних животиња је довољно дугачак да може лако да се предвиди преживљавање претходне животиње. Ако ипак дође до другог случаја смрти, одмах се завршава примена низа доза испитиване супстанце тако да се испитивање не врши даље ни на једној животињи. Будући да појава другог случаја угинућа (невезано од броја животиња које се испитују у моменту када се одлучи да се експеримент заврши) спада под исход А који је дат у Делу другом ове методе (две или више смрти), примењује се класификационо правило из Дела трећег ове методе при фиксној дози од 5 mg/kg (класификација у Категорију 1 ако дође до две или више случаја смрти, или у Категорију 2 уколико дође до смрти код једне животиње). У Делу петом ове методе дате су смернице за класификацију према Правилнику о класификацији, паковању, обележавању и оглашавању хемикалије и одређеног производа („Службени гласник РС”, бр. 59/10, 25/11 и 5/12), док не почне са применом Правилника о класификацији, паковању, обележавању и оглашавању хемикалије и одређеног производа у складу са Глобално хармонизованим системом за класификацију и обележавање УН („Службени гласник РС”, бр. 64/10 и 26/11).

1.5.3. Главно испитивање

1.5.3.1. Број животиња и дозни нивои

На дијаграму тока у Делу трећем ове методе приказани су поступци који се предузимају у испитивању након примене почетног дозног нивоа. Предузима се један од три корака: прекид испитивања и класификација у одговарајућу класу опасности или испитивање већом фиксном дозом или испитивање мањом фиксном дозом. Да би се заштитиле животиње, дозни ниво који је у претходном испитивању довео до смрти животиње не примењује се у главном испитивању (видети Део трећи ове методе). Искуство је показало да је при почетном дозном ниву највероватнији исход главног испитивања класификација испитиване супстанце, тако да даља испитивања нису неопходна.

За испитивање при сваком дозном ниву користи се укупно пет животиња истог пола. Групу од пет животиња чине једна животиња из претходног испитивања (којој је примењена одабрана фиксна доза) и додатне четири животиње (осим у посебним случајевима када се дозни ниво из главног испитивања није користио у претходном испитивању).

Временски размак између примене испитиване супстанце при сваком дозном ниву одређен је почетком, трајањем и озбиљношћу знакова токсичности. Третман животиња следећом дозом се одлаже све док се не уверимо у преживљавање претходно третираних животиња. Прави се временски размак од 3 до 4 дана између примене испитиване супстанце при сваком дозном ниву, како би се омогућио довољно дуг период за посматрање евентуалних одложених токсичних реакција. Овај временски интервал може по потреби да се мења, нпр. у случајевима у којима су посматрања нејасна. Када се разматра коришћење фиксне дозе од 5.000 mg/kg, потребно је пратити поступак који је описан у Делу четвртом ове методе (видети одељак 1.6.2. ове методе).

1.5.3.2. Испитивање граничне дозе

Испитивање граничне дозе примарно се користи у ситуацијама у којима истраживач има податке који указују да је испитивана хемикалија вероватно нетоксична, тј. да постаје токсична само изнад прописаних граничних доза. Подаци о токсичности испитиване хемикалије могу се преузети из завршених испитивања са сличним супстанцама или смешама, ако се узме у обзир идентитет и концентрација компонената изражена у процентима, за које се поуздано зна да су токсиколошки значајне. У случајевима где нема података о токсичности или их нема довољно, или када се очекује да ће испитивана хемикалија бити токсичана, потребно је испланирати и обавити главно испитивање.

За испитивање граничне дозе користи се већ установљен поступак, са почетном дозом дефинисаном у претходном испитивању од 2.000 mg/kg (или изузетно 5.000 mg/kg) и са накнадним увођењем додатне четири експериментне животиње на које ће се применити иста доза.

1.6. ПОСМАТРАЊА

Животиње се посматрају појединачно након примене прве дозе испитиване супстанце и то најмање једном током првих 30 минута и периодично током следећа 24 сата, уз посебну пажњу на прва 4 сата. Посматрања се затим обављају једанпут дневно, у периоду од укупно 14 дана, осим у случајевима када је животињу потребно искључити из испитивања (ако је пронађена мртва) или је лишити живота на хуман начин имајући у виду добробит животиње. Трајање посматрања не сме да буде строго дефинисано, већ га одређују токсични ефекти, почетак и трајање опоравка, а уколико постоји потреба може и да се продужи. Важни су периоди у којима се појављују и нестају први знаци токсичности, посебно ако се знаци токсичности јављају одложено[11]. Сва посматрања систематски се бележе, а за сваку животињу потребно је водити засебни картон са опажањима.

Ако животиње непрекидно показују знакове токсичности, потребна су додатна посматрања. Потребно је укључити и

промене на кожи и крзну, очима и мукозним мембранама, као и на респираторном, циркулаторном, аутономном и централном нервном систему, промене соматомоторне активности и промене понашања. Посебна пажња се обраћа на појаву тремора, конвулзија, саливације, пролива, летаргије, поспаности и коме. За дефинисање ових стања користе се принципи и критеријуми који су дати у литератури[8]. Животиње пронађене на самрти или оне које трпе јак бол или стрес, лишавају се живота на хуман начин. Када су животиње лишене живота из хуманих разлога или су пронађене мртве, потребно је што прецизније забележити време смрти.

1.6.1. Телесна маса

Индивидуална телесна маса животиња одређује се непосредно пре примене испитиване супстанце и најмање једном недељно након тог периода. Бележе се и израчунавају промене у телесној маси. На крају испитивања, мери се телесна маса преживелих животиња, а потом се лишавају живота на хуман начин.

1.6.2. Патолошка испитивања

Све испитиване животиње (укључујући и оне које угину у току испитивања или су искључене из испитивања због добробити животиње) потребно је постмортално прегледати. За сваку животињу бележе се све значајне патолошке промене. Микроскопским прегледом органа могу се добити корисни подаци, па је потребно обавити преглед органа који су постморталним прегледом показали значајне патолошке промене и то код животиња које су преживеле 24 или више сати након прве дозе.

2. ПОДАЦИ

Потребно је прикупити податке за сваку животињу. Сви подаци се табеларно приказују, а за сваку испитивану групу наводи се укупан број животиња у групи, број животиња које су показале знакове токсичности, број животиња које су пронађене мртве или број оних које се лишавају живота на хуман начин током испитивања, време смрти појединачних животиња, опис и временски ток токсичних ефеката и њихову реверзибилност, као и налазе постморталног прегледа.

3. ИЗВЕШТАЈ О ИСПИТИВАЊУ

ПИСАЊЕ ИЗВЕШТАЈА

Извештај о испитивању садржи:

1. Податке о испитиваној супстанци:

– физичка својства, чистоћу, и, када је значајно, физичка и хемијска својства (укључујући изомеризацију);

– идентификационе податке који укључују и CAS број.

2. Податке о вехикулуму (ако је значајно):

– образложење за избор вехикулума, уколико није вода.

3. Податке о експериментној животињи:

– врста/сој;

– микробиолошки статус животиње, ако је познат;

– број, старост и пол животиња (укључујући, када је значајно, образложење уколико се користе мужјаци уместо женки);

– извор, услове смештаја, исхране, итд.

4. Податке о условима испитивања:

– детаље о формулацији испитиване супстанце, укључујући физичко стање у коме је примењена формулација;

– детаље о примени испитиване супстанце укључујући запремине доза и време примене дозе испитиване супстанце;

– детаље о квалитету хране и воде укључујући детаље о врсти и извору хране и извору воде;

– образложење за избор почетне дозе.

5. Резултате:

– табеларни приказ резултата и примењене дозе за сваку животињу (животиње које показују знакове токсичности укључујући смртност, природу, интензитет и трајање токсичних ефеката);

– табеларни приказ телесне масе и промена телесне масе;

– индивидуалну телесну масу животиња на дан примене дозе испитиване супстанце, затим у недељним интервалима, и у време угинућа или лишавања живота на хуман начин;

– датум и време смрти, ако до ње дође пре предвиђеног лишавања живота на хуман начин;

– временски ток појаве знакова токсичности, и да ли су знакови били реверзибилни за сваку животињу;

– налазе постморталних прегледа и хистопатолошки налази за сваку животињу, уколико су доступни.

6. Дискусију и тумачење резултата.

7. Закључке.

4. ЛИТЕРАТУРА

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, 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, 279-291.

3. Van den Heuvel, M.J., Clark, D.G., Fielder, R.J., Koundakjian, P.P., Oliver, G.J.A., Pelling, D., Tomlinson, N.J. and Walker, A.P. (1990). The international validation of a fixed-dose procedure as an alternative to the classical LD50 test. Fd. Chem. Toxicol. 28, 469-482.

4. Whitehead, A. and Curnow, R.N. (1992). Statistical evaluation of the fixed-dose procedure. Fd. Chem. Toxicol., 30, 313-324.

5. Stallard, N. and Whitehead, A. (1995). Reducing numbers in the fixed-dose procedure. Human Exptl. Toxicol. 14, 315-323. Human Exptl. Toxicol.

6. Stallard, N., Whitehead, A. and Ridgeway, P. (2002). Statistical evaluation of the revised fixed dose procedure. Hum. Exp. Toxicol., 21, 183 -196.

7. OECD (2001). Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N. 24. Paris

8. OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assesment N. 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, I., Goddard, M., Segal, L., Springer, J.A. and Myers, R.C. (1995). Comparison of the Up-and-Down, Conventional LD50, and Fixed-Dose Acute Toxicity Procedures. Fd. Chem. Toxicol. 33, 223-231.

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

Део други

ДИЈАГРАМ ТОКА ЗА ПРЕТХОДНО ИСПИТИВАЊЕ

Исход:

- А Смрт
- Б Евидентна токсичност
- В Нема евидентне токсичности нити

*За исход А код дозе од 5 mg/kg постоји и додатни поступак којим се потврђује класификација(GHS): видети одељак 1.5.2

Део трећи

ДИЈАГРАМ ТОКА ЗА ГЛАВНО ИСПИТИВАЊЕ

Исход:

- А ≥ 2 смрти
- Б ≥ 1 евидентне токсичности или 1 смрт
- В Нема евидентне токсичности нити смрти

Величина групе:
5 животиња у свакој групи главног испитивања укључује и било коју животињу испитану на исту дозу из претходног испитивања

*Добробит животиња
Ако је ова доза изазвала смрт у претходном испитивању, експеримент се прекида и иде се на А

Део четврти

КРИТЕРИЈУМИ ЗА КЛАСИФИКАЦИЈУ ИСПИТИВАНИХ СУПСТАНЦИ СА ОЧЕКИВАНИМ ВРЕДНОСТИМА LD_{50} ИЗНАД 2.000 mg/kg ЗА КОЈЕ НИЈЕ ПОТРЕБНО ДОДАТНО ИСПИТИВАЊЕ

Критеријум за класификацију у класу опасности акутна токсичност Категорија 5 (по ГХС-у) омогућава идентификовање испитиваних супстанци које показују ниску акутну токсичност, али које под одређеним околностима могу да представљају опасност за осетљиве популације. Ове супстанце имају вредности LD_{50} (перорално) и LD_{50} (дермално) у опсегу доза од 2.000 mg/kg до 5.000 mg/kg или потпуно одговарајућих доза примењених другим путевима уноса. Испитиване супстанце класификују се у одговарајућу категорију опасности (Категорија 5 по ГХС-у) ако је: 2.000 mg/kg < LD_{50} < 5.000 mg/kg, у следећим случајевима:

а) ако било која од схема испитивања датих у Делу трећем ове методе упућује на ову категорију због учесталости смртних случајева,

б) ако постоје поуздани докази да је вредност LD_{50} у опсегу вредности који одговара Категорији 5; или ако друге студије токсичности спроведене на животињама или људима указују на потенцијалне акутне токсичне ефекте на здравље људи,

в) ако се екстраполацијом, проценом или мерењем података не установи припадност некој вишој класи опасности, а:

– постоје поуздани подаци који указују на значајне токсичне ефекте код људи или

– уочи се смрт при испитивањима која се врше ради класификације закључно у Категорију 4, пероралном применом одговарајуће дозе или

– стручном проценом се потврде значајни клинички знакови токсичности, при испитивањима која се врше ради класификације закључно у Категорију 4, при чему клинички знакови не укључују пролив, пилоерекцију или запуштени изглед или

– се стручном проценом потврди постојање значајних акутних токсичних ефеката из других испитивања спроведених на животињама.

ИСПИТИВАЊЕ ДОЗА ИЗНАД 2.000 mg/kg

Изузетно, у случајевима кад то оправдавају специфичне потребе, додатно може да се размотри примена фиксне дозе од 5.000 mg/kg. Због заштите животиња и њихове добробити не препоручује се испитивање дозе од 5.000 mg/kg. Примена ове дозе разматра се само у случајевима кад постоји велика вероватноћа да ће резултати испитивања имати значајан допринос заштити здравља људи или животиња[9].

Претходно испитивање

Правила за примену поступка који се састоји из низа корака који је дат у Делу другом ове методе, проширују се на примену дозе од 5.000 mg/kg. Када се у претходном испитивању користи почетна доза од 5.000 mg/kg, исход А (смрт) захтева испитивање и друге животиње на примену дозе од 2.000 mg/kg; исходи Б и В (евидентна токсичност или нема

токсичности) дозвољавају примену дозе од 5.000 mg/kg као почетне дозе у главном испитивању. Ако се не користи почетна доза од 5.000 mg/kg, испитивање се наставља до примене дозе од 5.000 mg/kg у случају исхода под Б или В при дози од 2.000 mg/kg; ако код примењене дозе од 5.000 mg/kg дође до исхода А тада се у главном испитивању користи почетна доза од 2.000 mg/kg, а исходи под Б и В налажу почетну дозу од 5.000 mg/kg у главном испитивању.

Главно испитивање

Правила за примену поступка из низа корака који је дат у Делу трећем ове методе, проширују се на примену дозе од 5.000 mg/kg. Када се у главном испитивању користи почетна доза од 5.000 mg/kg, исход А (две или више смрти) условљава испитивање друге групе животиња применом дозе од 2.000 mg/kg; док исход Б (евидентна токсичност и/или једна или мање смрти) или исход В (нема токсичности) доводе до класификације супстанце према ГХС-у. Ако се не користи почетна доза од 5.000 mg/kg, у случају исхода В, при дози од 2.000 mg/kg, испитивање се наставља до примене дозе од 5.000 mg/kg. Исход А код примењене дозе од 5.000 mg/kg доводи до класификације супстанце у Категорију 5 (према ГХС). Исходи Б или В доводе до немогућности класификације супстанце.

B.1 *tris* АКУТНА ОРАЛНА ТОКСИЧНОСТ – МЕТОДА ОДРЕЂИВАЊА КЛАСЕ АКУТНЕ ТОКСИЧНОСТИ

Део први

1. МЕТОДА ИСПИТИВАЊА

Ова метода испитивања заснива се на Упутству за испитивање OECD 423 (2001).

1.1. УВОД

Метода одређивања класе акутне токсичности[1] која је дата у овом испитивању јесте поступак (корак по корак) у коме се у сваком кораку користе по три животиње истог пола. У зависности од смртности односно стања на самрти код животиња, потребно је да се прође просечно два до четири корака да би се донео закључак о акутној токсичности испитиване супстанце. Овај поступак је репродуктиван (поновљив), користи веома мали број животиња и даје могућност класификације супстанци на сличан начин као и остале методе испитивања акутне токсичности. Метода одређивања класе акутне токсичности заснована је на биометријским евалуацијама[2, 3, 4, 5] са фиксним дозама које су раздвојене на одговарајући начин како би се омогућило рангирање супстанце за потребе класификације и процену опасности. Када је ова метода испитивања усвојена, 1996. године, била је у великој мери валидирана у *in vivo* испитивањима у односу на податке о вредности LD_{50} који су добијени из домаће[6] и међународне[7] литературе.

Упутство за избор најпогодније методе испитивања за одређену сврху може се пронаћи у литератури[8]. Овај документ садржи и додатне информације о извођењу и тумачењу резултата добијених методом испитивања B.1*tris*.

Испитиване супстанце се не примењују на животиње у дозама за које је познато да изазивају видљив бол и исцрпљеност услед корозивног или јаког иритативног ефекта. Животиње које су на самрти, које очито трпе јаке болове или показују знакове трајне исцрпљености лишавају се живота на хуман начин, и при тумачењу резултата испитивања узимају се у обзир као и животиње које су угинуле током испитивања. Критеријум за доношење одлуке о лишавању живота болесне или животиње на самрти, као и упутства за препознавање предстојеће и предвидљиве смрти дати су у литератури[9].

У овој методи испитивања користе се унапред одређене дозе, а резултати испитивања омогућавају да се супстанца рангира и класификује према Правилнику о класификацији, паковању, обележавању и оглашавању хемикалије и одређеног производа у складу са глобално хармонизованим системом за класификацију и обележавање УН односно ГХС[10].

Метода испитивања није намењена израчунавању прецизне вредности LD_{50}, али омогућава утврђивање дефинисаних опсега доза где је леталитет очекиван, јер се и у овој методи као циљни показатељ испитивања још увек користи смрт одређеног процента животиња. Метода испитивања омогућава одређивање вредности LD_{50} само у случају када најмање две примењене дозе доводе до леталитета који је виши од 0% а мањи од 100%. Коришћење унапред одређених доза које су изабране независно од испитиване супстанце, заједно са класификацијом која је јасно повезана са бројем животиња посматраних у различитим околностима, повећава могућност конзистентних извештаја и поновљивост.

Пре почетка студије узимају се у обзир сви доступни подаци о испитиваној супстанци. Подаци укључују идентитет и хемијску структуру супстанце, њена физичка и хемијска својства, резултате других *in vivo* или *in vitro* испитивања токсичности, токсиколошке податке структурно сличних супстанци, као и предвиђене начине коришћења супстанце. Ови подаци су неопходни да би се указало на важност извођења студије за заштиту здравља људи, а помажу и при избору одговарајуће почетне дозе.

1.2. ДЕФИНИЦИЈЕ

Акутна орална токсичност јесте својство хемикалије да изазове штетне ефекте након примене појединачне пероралне дозе или неколико пероралних доза у периоду од 24 сата.

Одложена смрт јесте угинуће животиња које не угину или нису животно угрожене током првих 48 сати, већ до угинућа долази у периоду посматрања од 14 дана.

Доза јесте количина примењене испитиване супстанце. Изражава се као маса испитиване супстанце по јединици телесне масе експерименталне животиње (mg/kg).

Евидентна токсичност јесте токсични ефекат код кога се јављају јасни знакови токсичности након примене испитиване супстанце (за примере видети литературу[3]), који су толико интензивни да би излагање следећој већој фиксној дози код животиња вероватно довело до јаког бола, стреса, исцрпљености, стања на самрти (критеријуми су дати у литератури[8]) или смртног исхода.

ГХС јесте скраћеница за Глобално хармонизован систем за класификацију и обележавање хемикалија УН. Развој овог система је заједнички напор OECD (здравље људи и животна средина), УН Комитета стручњака за транспорт опасног терета (физичка и хемијска својства) и Међународне организације рада (ILO) (саопштавање опасности), а координира га Међуорганизацијски програм за управљање хемикалијама (IOMC).

Неминовна смрт јесте очекивана смрт животиње која је на самрти или се њена смрт очекује пре планираног наредног времена посматрања. Симптоми који указују на ово стање код глодара су конвулзије, латерални положај, лежећи положај или тремор (за детаље видети литературу[8]).

LD_{50} (средња смртна доза) јесте статистички одређена појединачна доза супстанце за коју се очекује да изазива смртност код 50 посто испитиваних животиња када се примени пероралним путем. Вредност LD_{50} изражава се у јединици масе испитиване супстанце по јединици телесне масе експерименталне животиње (mg/kg).

Гранична доза јесте горња гранична доза која се користи у испитивању (2.000 mg/kg или 5.000 mg/kg).

Стање на самрти јесте стање дефинисано као немогућност преживљавања или неминовна смрт животиње, чак и након евентуалног третмана (за детаље видети литературу[8]).

Предвидљива смрт јесте стање које карактерише присутност клиничких знакова који указују на неминовну смрт животиње пре завршетка експеримента, на пример немогућност узимања воде или хране (за детаље видети литературу[8]).

1.3. ПРИНЦИП МЕТОДЕ

Принцип испитивања које је засновано на поступку (корак по корак) уз коришћење минималног броја животиња по кораку, јесте да се прикупи довољно података о акутној токсичности испитиване супстанце како би се омогућила њена класификација. Супстанца се даје групи експериментних животиња перорално у једној од одређених доза. Супстанца се испитује применом поступка (корак по корак), при чему се у сваком кораку користе три животиње истог пола (углавном женке). Изостанак или присуство знакова који упућују на смрт код животиња којима се примењује доза у једном од корака одређује следећи корак поступка, односно:

– да даља испитивања нису потребна,

– потребу примене исте дозе на додатне три животиње,

– потребу примене следеће више или ниже дозе на додатне три животиње.

Детаљи поступка испитивања дати су у Делу другом ове методе. Ова метода испитивања омогућава да се донесе закључак о класификацији, при чему се у обзир узима класификација испитиване супстанце у једну од низа класа токсичности које су дефинисане по фиксним LD_{50} граничним вредностима.

1.4. ОПИС МЕТОДЕ ИСПИТИВАЊА

1.4.1. Избор животињске врсте

Препоручена врста глодара је пацов, иако се за испитивања користе и друге животињске врсте. Најчешће се користе женке[9] јер је на основу литературе која се односи на испитивање LD_{50} уочено да је мала разлика у осетљивости полова при примени ове методе. У случајевима у којима је уочена разлика, женке су показале нешто већу осетљивост[11]. Ако се у литератури нађу токсиколошки или токсикокинетички подаци за структурно сличне хемикалије који указују на то да су мужјаци осетљивији на одређену испитивану супстанцу, користе се мужјаци за испитивање. Кад се испитивање изводи на мужјацима, наводи се оправданост за њихову примену.

Испитивање се изводи на здравим младим јединкама оних лабораторијских сојева који се уобичајено користе у оваквим испитивањима. Испитивање се врши на женкама које нису раније рађале и које нису гравидне. Свака животиња на почетку експеримента и примене првих доза испитиване супстанце треба да буде стара између 8 и 12 недеља, а њена телесна маса да буде у опсегу ± 20% од средње вредности масе претходно дозираних животиња.

1.4.2. Услови смештаја и исхрана

Температура просторије у којима се држе животиње је 22º C (± 3º C). Релативна влажност ваздуха износи најмање 30%, али не више од 70% (осим кад се просторије чисте), а идеално је влажност ваздуха одржавати између 50% и 60%. Осветљење је вештачко, и то у интервалима од 12 сати светла и 12 сати мрака. За исхрану се може примењивати уобичајена храна за лабораторијске животиње, са слободним приступом води за пиће. Животиње се према примењеној дози испитиване супстанце могу груписати у кавезе. Број животиња по кавезу не сме ни на који начин да омета процес праћења и посматрања сваке животиње.

1.4.3. Припрема животиња

Животиње се бирају насумце, обележавају ради лакшег разликовања, а да би се прилагодиле на лабораторијске услове држе се у кавезима најмање пет дана пре почетка експеримента и примене прве дозе испитиване супстанце.

1.4.4. Припрема доза

Испитиване супстанце примењују се у константним запреминама, па је неопходно прилагођавање концентрације за припремање различитих доза. При испитивању хемикалије у течном стању, примена неразблажене испитиване супстанце, односно супстанце која је у смеши у константној концентрацији, може да буде значајна каснију процену ризика од те супстанце. Максимална појединачна запремина дозе не сме да се прекорачи. Максимална запремина течности која сме да се примени зависи и од величине експерименте животиње. Запремина испитиване супстанце која се примењује код глодара не сме да прелази 1 ml/100g ТМ животиње, а уколико се примењује водени раствор може се размотрити и доза од 2 ml/100g ТМ животиње. Кад је реч о формулацији и припреми дозе, првенствено се препоручује примена воденог раствора/суспензије/емулзије, а затим раствора/суспензије/емулзије у уљу (нпр. кукурузном уљу) или раствор у неком другом вехикулуму. За све вехикулуме осим воде, неопходно је знати њихове токсиколошке карактеристике. Дозе се припремају непосредно пре примене, осим ако се ради о супстанци за коју је познато да је стабилна у раствору током дужег временског периода.

1.5. ПОСТУПАК

1.5.1. Примена доза

Испитивана супстанца примењује се у једној дози сондом директно у желудац или интубирањем канилом. У посебним околностима, када једнократна доза није могућа, испитивана супстанца може се применити у неколико мањих порција током временског периода који није дужи од 24 сата.

Пре почетка примене доза испитиване супстанце потребно је изгладнети животиње (нпр. пацовима је потребно ускратити храну али не и воду преко ноћи; мишевима је потребно ускратити храну али не и воду на 3 до 4 сата). Након периода гладовања, потребно је измерити телесну масу животиња и применити испитивану супстанцу. Након прве дозе, храна може поновно да се ускрати, и то: код пацова наредних 3 до 4 сата, а код мишева наредна 1 до 2 сата. Када се доза испитиване супстанце примени у неколико мањих порција у одређеном временском интервалу, може да се укаже потреба за храном и водом уколико се ради о продуженом временском периоду.

1.5.2. Број животиња и дозни нивои

У сваком кораку користе се по три животиње. Дозни ниво који ће се користити као почетна доза јесте једна од фиксних доза од 5 mg/kg, 50 mg/kg, 300 mg/kg и 2.000 mg/kg ТМ. Почетни дозни ниво јесте доза која са највећом вероватноћом изазива смрт код неких од укључених животиња. Дијаграми тока испитивања који су дати у Делу другом ове методе, описују поступак који се прати при примени сваке почетне дозе. У Делу осмом ове методе дате су смернице за класификацију према Правилнику о класификацији, паковању, обележавању и оглашавању хемикалије и одређеног производа („Службени гласник РС”, бр. 59/10, 25/11 и 5/12), док не почне са применом Правилника о класификацији, паковању, обележавању и оглашавању хемикалије и одређеног производа у складу са Глобално хармонизованим системом за класификацију и обележавање УН („Службени гласник РС”, бр. 64/10 и 26/11).

Уколико доступни подаци указују да при примени највише почетне дозе (2.000 mg/kg ТМ) вероватно неће доћи до смрти животиња, обавља се испитивање граничне дозе. Кад нема података о испитиваној супстанци, препоручено је, због добробити животиња, да почетна доза буде од 300 mg/kg ТМ.

Временски размак између примене испитиване супстанце при сваком дозном нивоу одређен је почетком, трајањем и озбиљношћу знакова токсичности. Третман животиња следећом дозом одлаже се све док се не уверимо у преживљавање претходно третираних животиња.

Изузетно, и само у случајевима када то оправдавају специфичне потребе, може да се размотри примена додатног дозног нивоа од 5.000 mg/kg ТМ (видети Део седми ове методе). Због добробити животиња, не препоручује се испитивање на животињама ради класификације испитиване супстанце у Категорију 5 (према ГХС-у) у опсегу доза од 2.000 mg/kg до 5000 mg/kg, и разматра се само у случајевима када постоји велика вероватноћа да ће резултати испитивања имати непосредан значај за заштиту здравља људи, животиња и животне средине.

1.5.3. Испитивање граничне дозе

Испитивање граничне дозе примарно се користи у ситуацијама када истраживач има поуздане податке да је испитивана хемикалија нетоксична, тј. да постаје токсична само изнад прописаних граничних доза. Подаци о токсичности испитиваних хемикалија могу се преузети из завршених испитивања на сличним хемикалијама, ако се узме у обзир идентитет и проценат компонената за које се поуздано зна да су токсиколошки значајне. У случајевима где нема података о токсичности или их нема довољно, или када се очекује да ће испитивана хемикалија бити токсична, потребно је испланирати и обавити главно испитивање.

Испитивање граничне дозе, при дозном нивоу од 2.000 mg/kg ТМ, може се спровести на шест животиња (три животиње по кораку) или, изузетно, при дозном нивоу од 5.000 mg/kg ТМ увођењем три животиње по кораку (видети Део седми ове методе). Уколико се покаже да је смрт животиња повезана са применом испитиване супстанце потребно је да се спроведе даље испитивање и при нижем дозном нивоу.

1.6. ПОСМАТРАЊА

Животиње се посматрају појединачно након примене прве дозе испитиване супстанце и то најмање једном током првих 30 минута и периодично током следећа 24 сата, уз посебну пажњу и нагласак на прва 4 сата. Посматрања се затим обављају једном дневно, у периоду од укупно 14 дана, осим у случајевима када је животињу потребно искључити из испитивања (ако је пронађена мртва) или је лишити живота на хуман начин имајући у виду добробит животиње. Трајање посматрања не сме да буде строго дефинисано, већ га одређују токсични ефекти, почетак и трајање опоравка, а уколико постоји потреба може и да се продужи. Важни су периоди у којима се појављују и нестају први знаци токсичности, посебно ако се знаци токсичности јављају одложено[12]. Сва посматрања систематски се бележе, а за сваку животињу потребно је водити засебни картон са опажањима.

Ако животиње непрекидно показују знакове токсичности, потребна су додатна посматрања. Потребно је укључити и промене на кожи и крзну, очима и мукозним мембранама, као и на респираторном, циркулаторном, аутономном и централном нервном систему, промене соматомоторне активности и промене понашања. Посебна пажња се обраћа на појаву тремора, конвулзија, саливације, пролива, летаргије, поспаности и коме. За дефинисање ових стања користе се принципи и критеријуми који су дати у литератури[9]. Животиње пронађене на самрти или оне које трпе јак бол или стрес, лишавају се живота на хуман начин. Када су животиње лишене живота из хуманих разлога или пронађене мртве, потребно је што прецизније забележити време смрти.

1.6.1. Телесна маса

Индивидуална телесна маса животиња одређује се непосредно пре примене испитиване супстанце и најмање једном недељно након тог периода. Бележе се и израчунавају и промене у телесој маси. На крају испитивања мери се телесна маса преживелих животиња, а потом се лишавају живота на хуман начин.

1.6.2. Патолошка испитивања

Све испитиване животиње (укључујући и оне које угину за време испитивања или су искључене из испитивања због

добробити животиње) потребно је постмортално прегледати. Све значајне патолошке промене бележе се за сваку животињу. Микроскопским прегледом органа могу се добити корисни подаци, па је потребно обавити преглед органа који су постморталним прегледом показали значајне патолошке промене и то код оних животиња које су преживеле 24 или више сати након прве дозе.

2. ПОДАЦИ

Потребно је прикупити податке за сваку животињу. Сви подаци се табеларно приказују, а за сваку испитивану групу наводи се укупан број животиња у групи, број животиња које су показале знакове токсичности, број животиња које су пронађене мртве или број оних које се лишавају живота на хуман начин током испитивања, време смрти појединачних животиња, опис и временски ток токсичних ефеката и њихову реверзибилност, као и налазе постморталног прегледа.

3. ИЗВЕШТАЈ О ИСПИТИВАЊУ

ПИСАЊЕ ИЗВЕШТАЈА

Извештај садржи:

1. Податке о испитиваној супстанци:

– физичка својства, чистоћа, и када је значајно, физичка и хемијска својства (укључујући изомеризацију);

– идентификационе податке, који укључују и CAS број.

2. Податке о вехикулуму (ако је значајно):

– образложење за избор вехикулума, уколико није вода.

3. Податке о експерименталној животињи:

– врста/сој;

– микробиолошки статус животиње, ако је познат;

– број, старост и пол животиња (укључујући, када је значајно, образложење уколико се користе мужјаци уместо женки);

– извор, услове смештаја, исхране, итд.

4. Податке о условима испитивања:

– детаље о формулацији испитиване супстанце, укључујући физичко стање у коме је примењена формулација;

– детаље о примени испитиване супстанце који укључују запремине доза и време примене дозе испитиване супстанце;

– детаље о квалитету хране и воде (укључујући детаље о врсти и извору хране и извору воде);

– образложење за избор почетне дозе.

5. Резултате:

– табеларни приказ резултата и примењене дозе за сваку животињу (животиње које показују знакове токсичности укључујући смртност, природу, интензитет и трајање токсичних ефеката);

– табеларни приказ телесне масе и промена телесне масе;

– индивидуалну телесну масу животиња на дан примене дозе испитиване супстанце, затим у недељним интервалима, и у време угинућа или лишавања живота на хуман начин;

– датум и време смрти, ако до ње дође пре предвиђеног лишавања живота на хуман начин;

– временски дијаграм појаве знакова токсичности, као и да ли су знакови били реверзибилни за сваку животињу;

– налазе постморталних прегледа и хистопатолошке налазе за сваку животињу, уколико су доступни.

6. Дискусију и тумачење резултата.

7. Закључке.

4. ЛИТЕРАТУРА

1. Roll R., Höfer-Bosse Th. And Kayser D. (1986). New Perspectives in Acute Toxicity Testing of Chemicals. Toxicol. Lett., Suppl. 31, 86.

2. Roll R., Riebschläger M., Mischke U. and Kayser D. (1989). Neue Wege zur Bestimmung der akuten Toxizität von Chemikalien. Bundesgesundheitsblatt 32, 336-341.

3. Diener W., Sichha L., Mischke U., Kayser D. and Schlede E. (1994). The Biometric Evaluation of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). Arch. Toxicol. 68, 559-610.

4. Diener W., Mischke U., Kayser D. and Schlede E. (1995). The Biometric Evaluation of the OECD Modified Version of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). Arch. Toxicol. 69, 729-734.

5. Diener W., and Schlede E. (1999) Acute Toxicity Class Methods: Alterations to LD/LC50 Tests. ALTEX 16, 129-134.

6. Schlede E., Mischke U., Roll R. and Kayser D. (1992). A National Validation Study of the Acute-Toxic- Class Method – An Alternative to the LD50 Test. Arch. Toxicol. 66, 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, 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://webnet1.oecd.org/oecd/pages/home/displaygeneral/0,3380,EN-documents-521-14-no-24-no-0,FF.html].

11. Lipnick R L, Cotruvo, J A, Hill R N, Bruce R D, Stitzel K A, Walker A P, Chu I; Goddard M, Segal L, Springer J A and Myers R C (1995) Comparison of the Up and Down, Conventional LD50, and Fixed Dose Acute Toxicity Procedures. Fd. Chem. Toxicol 33, 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.

Део други
ПОСТУПЦИ ЗА ПОЧЕТНЕ ДОЗЕ

ОПШТЕ НАПОМЕНЕ

У овом делу дате су схеме испитивања за сваку почетну дозу:

– Део трећи: Почетна доза је 5 mg/kg ТМ

– Део четврти: Почетна доза је 50 mg/kg ТМ

– Део пети: Почетна доза је 300 mg/kg ТМ

– Део шести: Почетна доза је 2000 mg/kg ТМ

У зависности од броја животиња које су лишене живота на хуман начин поступак испитивања означен је стрелицама.

Део трећи

Поступак испитивања са почетном дозом од 5 mg/kg телесне масе

Део четврти

Поступак испитивања са почетном дозом од 50 mg/kg телесне масе

Део седми

КРИТЕРИЈУМИ ЗА КЛАСИФИКАЦИЈУ ИСПИТИВАНИХ СУПСТАНЦИ СА ОЧЕКИВАНИМ ВРЕДНОСТИМА LD_{50} ИЗНАД 2.000 mg/kg ЗА КОЈЕ НИЈЕ ПОТРЕБНО ДОДАТНО ИСПИТИВАЊЕ

Критеријум за класификацију у класу опасности акутна токсичност Категорија 5 (по ГХС-у) омогућава идентификовање испитиваних супстанци које показују ниску акутну токсичност, али које под одређеним околностима могу да представљају опасност за осетљиве популације. Ове супстанце имају вредности LD_{50} (перорално) и LD_{50} (дермално) у опсегу доза од 2.000 mg/kg до 5.000 mg/kg или потпуно одговарајућих доза примењених другим путевима уноса. Испитиване супстанце класификују се у одговарајућу категорију опасности (Категорија 5 по) ако је: 2.000 mg/kg < LD_{50} < 5.000 mg/kg, у следећим случајевима:

а) ако било која од схема испитивања датих у Деловима трећем, четвртом, петом и шестом ове методе упућује на ову категорију због учесталости смртних случајева,

б) ако постоје поуздани докази да је вредност LD_{50} у опсегу вредности који одговара категорији 5; или ако друге студије токсичности спроведене на животињама или људима указују на потенцијалне акутне токсичне ефекте на здравље људи,

в) ако се екстраполацијом, проценом или мерењем података не установи припадност некој вишој класи опасности, а:

– постоје поуздани подаци који указују на значајне токсичне ефекте код људи или

– се уочи смрт при испитивањима која се врше ради класификације закључно у Категорију 4, пероралном применом одговарајуће дозе или

– се стручном проценом потврде значајни клинички знакови токсичности, при испитивањима која се врше ради класификације закључно у Категорију 4, при чему клинички знакови не укључују пролив, пилоерекцију или запуштени изглед или

– се стручном проценом потврди постојање значајних акутних токсичних ефеката из других испитивања спроведених на животињама.

ИСПИТИВАЊЕ ДОЗА ИЗНАД 2.000 mg/kg

Због заштите животиња и њихове добробити не препоручује се испитивање дозе од 5.000 mg/ kg за класификацију у класу опасности акутна токсичност Категорија 5 (по ГХС-у). Примена ове дозе разматра се само у случајевима кад постоји велика вероватноћа да ће резултати испитивања имати значајан допринос заштити здравља људи или животиња[10]. Даља испитивања са применом високих доза се не изводе.

Када се испитује доза од 5.000 mg/kg довољан је само један корак (нпр. три животиње). Ако угине прва животиња којој се примењује испитивана супстанца, доза се спушта на 2.000 mg/kg према правилима датим у схеми из Дела другог ове методе. Ако прва животиња преживи, у испитивање се укључују додатне две животиње. Ако угине само једна од три животиње, претпоставља се да је вредност LD_{50} изнад 5.000 mg/kg. Ако угину две животиње, наставља се примена испитиване супстанце у дози од 2.000 mg/kg.

Почетак

Део осми

Метода испитивања B.1 *tris*-Смернице за класификацију (преузето из литературе[8])

- Користе се 3 животиње истог пола(женке) по кораку
- 0,1,2,3-бр. жив. на смрти или умрлих по кораку

- ∞: некласификовано
- GHS (mg/kg т.м.)

Почетак
3 животиње 5 mg/kg
3 животиње 50 mg/kg
3 животиње 300 mg/kg
3 животиње 2000 mg/kg
2-3
0-1
0
GHS
Категорија 1 > 0 - 5
Категорија 2 > 5 - 50
Категорија 3 > 50 - 300
Категорија 4 > 300 - 2000
Категорија 5 > 2000 - 5000
∞
3*(50)
други
3
2
1
0
LD50 прих. конц. mg/kg т.м.
5 25 30 50 200 300 500 1000 2000 2500 5000 ∞
ЕУ/хем. тич. петиц.
25 200 2000 ∞
ЕУ петиц. у чврстом
5 500 ∞
UN хем. тич. ст.
5 50 500 ∞
UN хем. у чврстом ст.
5 50 200 ∞
Швајцарска
5 50 500 2000 5000 ∞
US EPA
25 ∞
Јапан FDSCA
30 300 ∞
Канада WHMIS/ US OSHA
50 500 ∞
US EPA пест.
50 500 5000 ∞
US CPSC
50 5000 ∞
Канада пест.
50 500 1000 2000 ∞
- Користе се 3 животиње истог пола(женке) по кораку
- 0,1,2,3-бр. жив. на самрти или умрлих по кораку
- ∞: некласификовано
- *: у првом кораку
- GHS (mg/kg т.м.)

Почетак
3 животиње 5 mg/kg
3 животиње 50 mg/kg
3 животиње 300 mg/kg
3 животиње 2000 mg/kg
2-3
0-1
GHS
Категорија 1 > 0 - 5
Категорија 2 > 5 - 50
Категорија 3 > 50 - 300
Категорија 4 > 300 - 2000
Категорија 5 > 2000 - 5000
∞
3*(50)
други
3*(300)
3
2
1
0
5 25 30 50 200 300 500 1000 2000 2500 5000 ∞
25 200 2000 ∞
5 500 ∞
5 50 500 ∞
5 50 200 ∞
5 50 500 2000 5000 ∞
US EPA
25 ∞
30 300 ∞
50 500 ∞
50 500 5000 ∞
50 5000 ∞
50 500 1000 2000 ∞
- Користе се 3 животиње истог пола(женске) по кораку
- 0,1,2,3-бр. жив. на смрти или умрлих по кораку
- ∞: минимум 10 жив.
- *: у првом кораку
- GHS:(mg/kg т.м.)

B.2. АКУТНА ИНХАЛАЦИОНА ТОКСИЧНОСТ

1. МЕТОДА ИСПИТИВАЊА

1.1. УВОД

Корисно је имати претходне податке о својствима супстанце као што су: расподела, величина честица, притисак паре, тачка топљења, тачка кључања, тачка паљења и експлозивност (ако се ради о експлозивној супстанци).

Видети Општи увод, Део А.

1.2. ДЕФИНИЦИЈЕ

Видети Општи увод, Део Б.

1.3. РЕФЕРЕНТНЕ СУПСТАНЦЕ

Нису прописане.

1.4. ПРИНЦИП МЕТОДЕ

Неколико група експерименталних животиња излаже се испитиваној супстанци која се примењује у растућим концентрацијама кроз дефинисани временски период, тако да се на једну групу животиња примењује једна концентрација. Бележе се запажања о ефектима примењених концентрација и смртност код животиња. Оне животиње које угину за време испитивања пост-мортално се прегледају. По завршетку испитивања и преживеле животиње се лишавају живота на хуман начин и пост-мортално прегледају.

Оне животиње које показују тешке и трајне знаке токсичности и бола лишавају се живота на хуман начин. Избегава се примена испитиване супстанце у концентрацијама за које се поуздано зна да ће код животиња услед корозивног или јаког иритативног својства изазвати значајан бол и патњу.

1.5. КРИТЕРИЈУМИ КВАЛИТЕТА

Нису прописани.

1.6. ОПИС МЕТОДЕ

1.6.1. Припрема

Животиње се чувају у одговарајућим условима смештаја и исхране према дефинисаном режиму најмање пет дана пре почетка експеримента. Здраве младе животиње насумце се разврставају у претходно дефинисани број група. Није потребно да се животиње подвргну симулираном излагању, осим ако то није посебно наведено у упутству за апаратуру за инхалационо излагање.

Чврсте испитиване супстанце уситњавају се до честица одговарајуће величине.

Када је неопходно, додаје се вехикулум којим се постиже одговарајућа концентрација испитиване супстанце у атмосфери. За додати вехикулум поставља се и контролна група. Одабрани вехикулум и други адитиви који се користе да олакшају примену испитиване супстанце не смеју да изазивају токсичне ефекте. Ако је потребно могу се користити подаци из литературе.

1.6.2. Услови испитивања

1.6.2.1. Експериментална животиње

Ако не постоје контраиндикације, препоручена врста је пацов и то сојеви који се најчешће користе у лабораторијским испитивањима. За оба пола, на почетку испитивања, опсег у коме се креће телесна маса животиња не сме да прелази ± 20% од средње вредности.

1.6.2.2. Број и пол

Најмање 10 глодара (пет женки и пет мужјака) користи се за сваку испитивану концентрацију. Испитивање се врши на женкама које нису раније рађале и које нису гравидне.

Напомена: У испитивањима акутне токсичности на животињама вишег реда од глодара, може се размотрити и коришћење мањег броја јединки. Дозе се пажљиво бирају, уз настојање да се избегну дозе које су веће од средњих токсичних доза. У оваквим испитивањима се не примењују леталне дозе испитиване супстанце.

1.6.2.3. Концентрације излагања

Користи се најмање три концентрације испитиване супстанце, а њихов избор покрива опсег токсичних ефеката и стопе смртности. Подаци омогућавају конструисање криве зависности концентрације и смртности, и где је могуће, одређивање вредности LC_{50}.

1.6.2.4. Испитивање граничне дозе

Ако се пет мужјака и пет женки изложе концентрацији од 20 mg/L гаса или 5 mg/L аеросола или честица у трајању од четири сата (или се изложе максималној могућој концентрацији, када није могуће постићи ову концентрацију због физичких и хемијских својстава укључујући експлозивна својства испитиване супстанце) и при томе током 14 дана не дође до смртних случајева, даља испитивања се обустављају.

1.6.2.5. Време излагања

Време излагања је четири сата.

1.6.2.6. Опрема

Животиње се подвргавају испитивању помоћу опреме која је дизајнирана тако да омогући динамички проток ваздуха са најмање 12 потпуних измена у једном сату, како би се омогућила одговарајућа концентрација кисеоника и равномеран распоред у атмосфери. Када се користи комора, она је довољно пространа за животиње и да омогући максималну изложеност испитиваној супстанци удисањем. Опште правило које обезбеђује стабилност атмосфере у комори, јесте да укупна „запремина" животиња на које се примењује испитивана супстанца није буде већа од 5% укупне запремине коморе. Користе се различити типови комора који омогућавају изложеност читавог тела, само главе или само оро-назалних отвора животиње. Последње две коморе минимизирају изложеност испитиваној супстанци при другим путевима уноса.

1.6.2.7. Време посматрања

Посматрања се обављају у трајању од најмање 14 дана. Овај временски интервал није фиксно одређен. Њега одређују, између осталог, токсични ефекти, њихова учесталост, као и време трајања опоравка. Време посматрања се, по потреби, може и продужити. Важно је забележити време код којег се јаве или нестану први знаци токсичности, као и време смрти, поготово ако постоји тенденција да време смрти буде одложено.

1.6.3. Поступак

Непосредно пре него што се експериментална животиња изложи испитиваној супстанци мери се њена телесна маса. Животиње се у периоду од четири сата излажу испитиваним концентрацијама у коморама које су претходно уравнотежене. Време потребно за уравнотежење концентрација у комори је кратко. Температура на којој се обавља испитивање одржава се на 22° C ± 3° C, а релативна влажност између 30% и 70%. У неким случајевима (нпр. код испитивања аеросола) ово није

изводљиво. Одржавањем негативног притиска унутар коморе (≥ 5 mm воде) спречиће се цурење испараване супстанце у околну зону. За време излагања испитиваној супстанци животињама не сме да се даје храна и вода. У току експеримента се користе одговарајући системи за одржавање и праћење услова унутар коморе. Систем омогућава стабилне услове и њихово успостављање у што краћем временском року. Комора мора да буде дизајнирана на такав начин да омогућава хомогену дистрибуцију атмосфере за време испитивања.

Мере се и прате следећи параметри:

а) брзина протока ваздуха (непрекидно);

б) концентрације испитиване супстанце у инхалационој зони најмање три пута током излагања животиња (аеросоли на високим температурама захтевају и чешће праћење). Током периода излагања испитиваној супстанци, концентрације не смеју да варирају више од ± 15% од средње вредности. Код аеросола тешко се постиже овај ниво контроле, па се у том случају толеришу веће разлике у вредностима. За аеросоле је потребно обавити и анализу величине честица (најмање једанпут у свакој групи животиња);

в) температура и влажност (непрекидно, ако је могуће).

Запажања се бележе систематично за време и након излагања испитиваној супстанци, и за сваку животињу води се засебан картон. Првог дана запажања се чешће бележе. Пажљиви клинички преглед животиње потребно је урадити најмање једанпут сваког радног дана, а преостала посматрања бележе се свакодневно уз предузимање одговарајућих активности којима се на најмању меру своди губитак животиња из студије. На угинулим животињама ради се пост-мортални преглед или се оне одлажу на хлађење, а животиње које су изразито слабе или на самрти издвајају се из групе или се лишавају живота на хуман начин.

Бележе се промене на кожи и крзну, очима, мукозним мембранама, респираторном, циркулаторном, аутономном и централном нервном систему, као и соматомоторна активност и начин понашања. Посебна пажња се посвећује начину дисања, тремору, конвулзијама, саливацији, проливу, летаргији, поспаности и коми код животиња. Време смрти бележи се што прецизније. Телесна маса сваке појединачне животиње одређује се једном недељно након првобитног излагања испитиваној супстанци, као и у време смрти (лишавања живота на хуман начин). Животиње које угину за време испитивања и оне које преживе до самог краја пост-мортално се прегледају са посебном пажњом на промене у горњем и доњем респираторном тракту. Све значајније патолошке промене се бележе. Када је неопходно, узимају се и узорци ткива за хистопатолошка испитивања.

2. ПОДАЦИ

Подаци се наводе табеларно. За сваку испитивану групу животиња наводи се: број животиња на почетку испитивања, време смрти за сваку животињу, број оних које су показале знакове токсичности, опис токсичних ефеката и налази пост-морталног прегледа. Када животиње преживе дуже од једног дана израчунавају се и бележе промене у њиховој телесној маси. Животиње које се лишавају живота на хуман начин, због интензитета изазваног ефекта или бола, наводе се као угинућа изазвана деловањем супстанце. Вредност LC_{50} одређује се применом једне од стандардних метода испитивања.

Процена податка укључује и потенцијалну повезаност између изложености животиње испитиваној супстанци и учесталости појаве и тежине уочених абнормалности. Наводе се и промене у понашању, клиничке промене, појава већих оштећења, промене телесне масе, смртност, као и други токсични ефекти.

3. ИЗВЕШТАЈ О ИСПИТИВАЊУ

3.1. ПИСАЊЕ ИЗВЕШТАЈА

Извештај о испитивању, ако је могуће, садржи податке о:

1) Експерименталној животињи:

– врста, сој, извор, услови смештаја, исхрана итд.

2) Условима испитивања:

– опис апаратуре за инхалационо излагање која подразумева: дизајн, тип, димензије, извор ваздуха, систем за стварање аеросола, методу за кондиционирање ваздуха и начин смештаја животиња у комори када се користи. Описује се и апаратура за мерење температуре, влажности, концентрације аеросола и одређивање расподеле величине честица.

3) Излагању испитиваној супстанци:

Ови подаци наводе се табеларно заједно са средњим вредностима и мерама одступања (стандардна девијација), а, ако је могуће, укључују и податке о:

а) брзини протока ваздуха, опреми за инхалацију;

б) температури и влажности ваздуха;

в) номиналној концентрацији (укупном садржају испитиване супстанце у опреми за инхалацију, подељеном са запремином ваздуха);

г) природи вехикулума, ако је коришћен;

д) тачној концентрацији супстанце у зони удисања;

ђ) просечном аеродинамичком пречнику (The mass median aerodynamic diameter, MMAD) и геометријској стандардној девијацији (The geometric standard deviation, GSD);

е) времену предвиђеном за постизање равнотеже у комори;

ж) времену излагања;

4) Резултатима:

– табеларни приказ података подељених према полу и нивоу изложености (број мртвих животиња или животиња лишених живота на хуман начин током трајања испитивања; број животиња које су показале знаке токсичности; број изложених животиња, итд);

– време смрти за време или након излагања, разлози и критеријуми за усмрћивање животиња на хуман начин;

– сва опажања;

– LC_{50} вредности за сваки пол одређене на крају периода посматрања (са прописаном методом израчунавања);

– 95% интервал поузданости за LC_{50} вредности (где је могуће);

– крива зависности доза/смртност и нагиб (уколико то омогућава метода одређивања);

– налази пост-морталних прегледа;

– сви хистопатолошки налази;

– образложење резултата (посебна пажња се посвећује утицају које може имати лишавање живота животиња из хуманих разлога за време испитивања на израчунату вредност LC_{50});

– тумачење резултата.

3.2. ПРОЦЕНА ПОДАТАКА И ТУМАЧЕЊЕ РЕЗУЛТАТА

Видети Општи увод, Део Г.

4. ЛИТЕРАТУРА

Видети општи увод, Део Д.

B.3. АКУТНА ДЕРМАЛНА ТОКСИЧНОСТ

1. МЕТОДА ИСПИТИВАЊА

1.1. УВОД

Видети општи увод, Део А.

1.2. ДЕФИНИЦИЈЕ

Видети општи увод, Део Б.

1.3. РЕФЕРЕНТНЕ СУПСТАНЦЕ

Нису прописане.

1.4. ПРИНЦИП МЕТОДЕ

Испитивана супстанца примењује се на кожу код више група животиња, у растућим дозама, тако да се једној групи животиња примењује једна доза. Након тога посматрају се ефекти примењених доза и бележи број угинулих животиња. Животиње које угину током испитивања пост-мортално се прегледају. На крају испитивања и преживеле животиње се лишавају живота на хуман начин и пост-мортално прегледају.

Животиње које показују изразите знакове патње и бола, лишавају се живота на хуман начин. Избегава се примена испитиване супстанце у концентрацијама за које се поуздано зна да ће код животиња изазвати знатан бол и патњу услед иритације или корозивног ефекта.

1.5. КРИТЕРИЈУМИ КВАЛИТЕТА

Нису прописани.

1.6. ОПИС МЕТОДЕ

1.6.1. Припрема

Животиње се држе у експерименталним кавезима и хране се по дефинисаном експерименталном режиму најмање пет дана пре почетка испитивања. Здраве младе животиње насумце се деле у претходно дефинисани број група. Приближно 24

сата пре почетка испитивања животињама се уклања крзно бријањем дорзалног дела тела. Код шишања или бријања крзна потребно је обратити пажњу да се не озледи кожа јер би то могло да утиче на њену пермеабилност (пропустљивост). За примену испитиване супстанце потребно је да се припреми најмање 10% од укупне површине коже животиње. Ако се испитује чврста супстанца, која се по потреби може уситнити до праха, добијени прашак потребно је добро овлажити водом или неким другим вехикуломом како би се омогућио добар контакт са кожом. Ако се користи одређени вехикулум, узима се у обзир и његов утицај на пенетрацију (продирање) испитиване супстанце кроз кожу. Испитиване супстанце које се већ налазе у течном облику најчешће се користе неразблажене.

1.6.2. Услови испитивања

1.6.2.1. Експериментални животиње

За испитивање најчешће се користе кунићи или пацови. И друге врсте животиња могу да се користе али то захтева додатно образложење, будући да се препоручују већ устаљене животињске врсте. На почетку испитивања, опсег телесне масе животиња за сваки пол не сме да прелази ± 20% од одговарајуће средње вредности.

1.6.2.2. Број и пол

Најмање пет животиња користи се за сваки дозни ниво. Све животиње су истог пола. Ако се користе женке, испитивање се врши на женкама које нису раније рађале и које нису гравидне. Ако постоје подаци на основу којих је показано да је одређени пол осетљивији код оваквих испитивања, користи се тај пол.

Напомена: У испитивањима акутне токсичности на животињама вишег реда од глодара, може да се размотри и коришћење мањег броја животиња. Дозе се пажљиво бирају, и не користе се дозе веће од средње токсичних доза. У оваквим испитивањима избегавају се леталне дозе испитиване супстанце.

1.6.2.3. Дозни нивои

Користи се најмање три дозе испитиване супстанце, а њихов избор је такав да код испитиване групе животиња изазове читав опсег токсичних ефеката и смртност. Код одређивања примењених доза, узимају се у обзир потенцијални иритативни и корозивни ефекти. Води се рачуна и о количини добијених података како би се могла конструисати крива доза/одговор, а где је то могуће, одређује се и вредност LD_{50}.

1.6.2.4. Испитивање граничне дозе

Испитивање граничне дозе при једном дозном нивоу може да се изводи применом испитиване супстанце од 2.000 mg/kg ТМ на групи од пет мужјака и пет женки, према поступку који је описан у Методи испитивања B.1*bis.,* Део први одељак 1.5.3. Ако дође до смрти услед примене наведене дозе испитиване супстанце, разматра се цела студија.

1.6.2.5. Период посматрања

Период посматрања траје најмање 14 дана. Овај временски период није строго одређен. Њега одређују, између осталог, токсичне реакције, њихова учесталост, као и време трајања опоравка. Време посматрања може да се продужи. Важно је да се забележи време појаве или нестанка првих знакови токсичности, као и време смрти, поготово ако се примети да је време смрти одложено.

1.6.3. Поступак

Животиње се држе у кавезима за појединачно и одвојено држање. Испитивана супстанца примењује се равномерно преко површине која износи отприлике 10% од укупне површине коже. За примену веома токсичних супстанци, изложена површина може да буде и мања, али је у том случају потребно водити рачуна да се примењени слој равномерно распореди у што тањем слоју.

Испитивана супстанца држи се у контакту са кожом током 24 сата помоћу порозне газе на коју се наноси, при чему се газа љепљивом траком-фластером прилепи на кожу животиње. Место примене додатно се може прекрити како би се осигурало да испитивана супстанца не дође у контакт са устима животиње. Ако је неопходно, на животињу се могу ставити и додатни штитници којима се спречава пеорорално уношење испитиване супстанце. Не препоручује се потпуна имобилизација животиње.

Након прописаног времена излагања испитиваној супстанци, уклања се вишак испитиване супстанце или водом где је то могуће или неким другим одговарајућим начином за чишћење коже.

Запажања се бележе систематично. За сваку животињу води се засебни картон. Првог дана запажања се чешће бележе. Пажљиви клинички преглед животиње потребно је урадити најмање једанпут сваког радног дана, а преостала посматрања бележе се свакодневно уз предузимање одговарајућих активности којима се на најмању меру своди губитак животиња из студије. На угинулим животињама потребно је урадити пос-мортални преглед или се оне одлажу на хлађење, а животиње које су изразито слабе или на самрти издвајају се из групе или се лишавају живота на хуман начин.

Бележе се промене на кожи и крзну, очима, мукозним мембранама, респираторном, циркулаторном, аутономном и централном нервном систему, као и соматомоторна активност и начин понашања. Посебна пажња се посвећује начину дисања, тремору, конвулзијама, саливацији, проливу, летаргији, поспаности и коми код животиња. Време смрти бележи се што прецизније. Животиње које угину за време испитивања и оне које остану живе до самог краја пост-мортално се прегледају. Све значајније патолошке промене бележе. Када постоје индикације, узимају се и узорци ткива за хистопатолошка испитивања.

Процена токсичности код супротног пола:

По завршетку студије у којој се користе животиње само једног пола, иста доза испитиване супстанце примењује се на најмање једну групу од пет животиња супротног пола да би се утврдило да ли супротни пол показује већу осетљивост при примени испитиване супстанце Може се размотрити и коришћење мањег броја животиња, зависно од околности. Када су доступни одговарајући подаци на основу којих је показано да је пол животиња које су одабране у првобитном испитивању значајно осетљивији на испитивану супстанцу, изоставља се испитивање на животињама супротног пола.

2. ПОДАЦИ

Подаци се наводе табеларно. За сваку испитивану групу животиња наводи се: број животиња на почетку испитивања, време смрти за сваку животињу, број оних које су показале знакове токсичности, опис токсичних ефеката и налазе пост-морталног прегледа. Индивидуална телесна маса животиња мери се и бележи непосредно пре примене испитиване супстанце, затим једном недељно, и у време смрти. Када животиње преживе дуже од једног дана израчунавају се и бележе промене у њиховој телесној маси. Животиње које се лишавају живота на хуман начин, због интензитета патње или бола, наводе се као угинућа изазвана деловањем супстанце. Вредност LD_{50} одређује се једном од стандардних метода испитивања.

Процена податка укључује и потенцијалну повезаност између изложености животиње испитиваној супстанци и учесталости појаве и тежине уочене абнормалности. Наводе се промене у понашању, клиничке промене, појава већих оштећења, промене телесне масе, смртност као и други токсични ефекти.

3. ИЗВЕШТАЈ О ИСПИТИВАЊУ

3.1. ПИСАЊЕ ИЗВЕШТАЈА

Извештај о испитивању, ако је могуће, садржи податке о:

1) Експерименталној животињи:

– врста, сој, извор, услови смештаја, исхрана итд.

2) Условима испитивања:

– начин коришћен за чишћење коже и тип облога; оклузивни или не-оклузивни;

– дозни нивои (концентрација вехикулума, ако је коришћен);

– пол експерименталних животиња;

3) Резултатима:

– табеларни приказ података који су подељени према полу и дозним нивоима (број угинулих или животиња лишених живота на хуман начин током трајања испитивања; број животиња које су показале знакове токсичности; број изложених животиња, итд.);

– време смрти након излагања, узроци и критеријуми за лишавање живота на хуман начин;

– сва посматрања;

– вредност LD_{50} за онај пол животиња који је коришћен у испитивању, одређен након 14 дана применом прописане методе испитивања;

– 95% интервал поузданости за LD_{50} вредности (када је могуће);

– крива зависности доза/смртност и нагиб (када метода омогућава њено конструисање);

– налази пост-морталног прегледа;

– хистопатолошки налази;

– образложење резултата (посебна пажња се посвећује утицају које лишавање живота на хуман начин за време испитивања може да има на израчунату вредност LD_{50});

– тумачење резултата.

3.2. ПРОЦЕНА ПОДАТАКА И ТУМАЧЕЊЕ РЕЗУЛТАТА

Видети Општи увод, Део Г.

4. ЛИТЕРАТУРА

Видети Општи увод, Део Д.

B.4. АКУТНА ТОКСИЧНОСТ: ИРИТАЦИЈА/КОРОЗИВНО ОШТЕЋЕЊЕ КОЖЕ

Део први

1. МЕТОДА ИСПИТИВАЊА

Ова метода заснива се на Упутству за испитивање OECD 404 (2002).

1.1. УВОД

У припреми ажуриране верзије ове методе испитивања, посебна пажња посвећена је могућим побољшањима у односу на добробит животиња, као и процени свих постојећих података о испитиваној супстанци, са циљем да се избегну непотребна испитивања на животињама. Метода испитивања заснива се на препоруци да се пре *in vivo* испитивања иритативног или корозивног ефекта супстанце обави анализа квалитета постојећих података. Када нема довољно података, могуће их је добити применом испитивања корак по корак[1]. Стратегија испитивања укључује и извођење валидираних и прихваћених *in vitro* или *ex vivo* испитивања која су описана у Делу трећем ове методе. Када је прихватљиво у иницијалном *in vivo* испитивању, препоручује се сукцесивна (један за другим), а не истовремена, примена три „patch" теста на животињу.

У интересу научне заснованости и добробити животиња јесте да се *in vivo* испитивања започињу тек након анализе квалитета свих доступних података који су релевантни за процену потенцијала супстанце да изазове иритацију/корозивно оштећење. Такви подаци обухватају: доказе на основу налаза код људи односно из претходно спроведених студија на лабораторијским животињама, доказе о ефектима иритације/корозивног оштећења за једну или више структурно сличних супстанци или смеша таквих супстанци, податке који указују на јаку киселост или базност испитиване супстанце[2, 3], или податке из претходно валидираних и прихваћених *in vitro* или *ex vivo* испитивања[4, 5, 5a]. Оваква анализа смањиће потребу за *in vivo* испитивањима иритације/корозивног оштећења коже за оне супстанце за које постоји довољно индиректних доказа на том пољу.

У Делу трећем ове методе описана је стратегија испитивања корак по корак која укључује и обављање валидираних и прихваћених *in vitro* или *ex vivo* испитивања иритације/корозивног оштећења коже. Стратегију су развили, као јединствено прихваћену и препоручену, чланови радне групе OECD[6], а прихваћена је и уврштена у препоручене стратегије испитивања од стране Глобално хармонизованог система за класификацију и обележавање (у даљем тексту: ГХС)[7]. Препоручује се праћење ове стратегије пре предузимања било каквих *in vivo* испитивања. За нове супстанце које још нису биле испитиване за прикупљање података о њиховим иритативним/корозивним ефектима за кожу препоручен је приступ испитивања „корак по корак". За супстанце које су већ укључене у испитивања, иста стратегија се примењује за употпуњавање података о иритативним/корозивним ефектима за кожу. Уколико се примени другачија стратегија испитивања или поступка, или се одлучи да се не примени ова метода испитивања, потребно је објаснити и образложити разлоге овакве одлуке.

Ако се одређивање иритативних/корозивних ефеката испитиване супстанце на кожи не може утврдити на основу анализе квалитета постојећих података, у складу са стратегијом испитивања корак по корак, потребно је размотрити обављање *in vivo* испитивања (видети Део трећи ове методе).

1.2. ДЕФИНИЦИЈЕ

Иритација коже јесте настанак реверзибилних оштећења коже која прате примену испитиване супстанце након излагања у трајању од 4 сата.

Корозивно оштећење коже јесте настанак иреверзибилних оштећења коже односно видљиве некрозе у епидермису и дермису након четворочасовне примене испитиване супстанце. Корозивно оштећење коже карактерише се према типу изазваног оштећења као: улкус, крварење или крваве красте и на крају периода посматрања од 14 дана према промени боје коже условљене перутањем и појави површина са алопецијом и ожиљног ткива. У циљу процене нејасних оштећења обављају се хистопатолошка испитивања.

1.3. ПРИНЦИП МЕТОДЕ

Испитивана супстанца примењује се у једној дози на кожу експерименталне животиње, а нетретирани делови коже служе као контрола. Степен иритативних/корозивних ефекта на кожи очитава се и оцењује у претходно утврђеним временским интервалима, при чему се додатно сваки ефекат појединачно описује како би се добила комплетна процена штетних ефеката. Студија траје довољно дуго, да би могли да се донесу закључци о реверзибилности или иреверзибилности забележених штетних ефеката.

Животиње које у било ком делу испитивања показују сталне знакове патње или бола, лишавају се живота на хуман начин, а супстанца се процењује у складу са тим. Критеријуми за доношење одлуке о лишавању живота на хуман начин оних животиња које су на самрти и показују знаке изразите патње, описани су у литератури[8].

1.4. ОПИС МЕТОДЕ

1.4.1. Припрема за *in vivo* испитивање

1.4.1.1. Избор животињске врсте

Препоручује се коришћење здравих младих јединки албино кунића. Уколико се користи друга животињска врста, наводе се разлози за ово коришћење.

1.4.1.2. Припрема животиња

Приближно 24 сата пре почетка испитивања животињама се уклања крзно бријањем дорзалног дела тела. Код бријања крзна, потребно је обратити пажњу да се не повреди кожа јер се за испитивање користите искључиво оне животиње чија је кожа неоштећена (интактна).

Неке врсте кунића имају густо крзно на појединим деловима коже, зависно од годишњег доба. Испитивање се не врши на овим површинама коже.

1.4.1.3. Услови смештаја животиња и исхрана

Животиње се смештају у одговарајући смештај за појединачно и одвојено држање. Температура смештајног простора у коме се држе кунићи одржава се на 20° C (± 3° C). Релативна влажност ваздуха је најмање 30% и да не прелази 70% (осим у случајевима када се просторија са животињама чисти). Идеална влажност је између 50% и 60%. Осветљење је вештачко и то у интервалима од 12 сати светла и 12 сати мрака. Животиње се хране уобичајеном храном за лабораторијске животиње, са слободним приступом води за пиће.

1.4.2. Поступак

1.4.2.1. Примена испитиване супстанце

Испитивана супстанца наноси се на малу површину коже (отприлике 6 cm^2) и прекрива газом која се фиксира помоћу фластера. У случајевима кад директно наношење није могуће (нпр. код течности или неких паста), испитивана супстанца се прво наноси на газу, а затим се газа поставља на кожу. Облога од газе је у лаганом контакту с кожом, тако да буде полу затворена (семи-оклузивна) током периода излагања. Ако се испитивана супстанца наноси на облогу, а не директно на кожу, облога се фиксира на кожу тако да се оствари добар контакт и да се супстанца равномерно расподели по површини коже. Потребно је онемогућити приступ животиње облози, као и инхалацију или довођење у контакт са устима животиње (ингестију) испитиване супстанце.

Испитиване супстанце које се налазе у течном стању, најчешће се користе неразблажене. Ако се испитује чврста супстанца, која се по потреби може уситнити до праха, добијени прашак потребно је добро овлажити у што мањој запремини воде или неком другом вехикулуму како би се омогућио добар контакт са кожом. Ако се користи вехикулум које није вода, могући утицај тог вехикулума на иритацију коже своди се на најмању меру.

Након излагања, које уобичајено траје четири сата, вишак испитиване супстанце испира се водом или се уклања помоћу одговарајућег средства, без промене ефеката на кожи и интегритета епидермиса.

1.4.2.2. Дозни ниво

На припремљени део коже наноси се 0,5 mL течне супстанце или 0,5 g чврсте супстанце или супстанце у облику пасте.

1.4.2.3. Иницијално испитивање
(in vivo испитивање иритације/корозивног оштећења коже
на једној животињи)

Строга је препорука да се *in vivo* испитивање иницијално изводи само на једној животињи, нарочито ако се сумња да би испитивана супстанца могла да изазове корозивно оштећење коже. Ова препорука је у складу са стратегијом испитивања корак по корак из Дела трећег ове методе. Када је на основу анализе квалитета података донета стручна процена да је испитивана супстанца корозивна, нису неопходна даља испитивања на животињама. За већину супстанци за које се сумња да изазивају корозивно оштећење коже не сматрају се неопходним даља *in vivo* испитивања. У случајевима када нема довољно доказа, потребни су додатни подаци, при чему се обављају испитивања граничне дозе коришћењем следећег приступа: највише три облоге се једна за другом (узастопно) наносе на кожу животиње. Прва облога се уклања након три минута и ако се при томе не уочи јака реакција на кожи, наноси се и друга облога која се уклања након једног сата. Ако уочене промене у овој фази указују да се излагање испитиваној супстанци може проширити на четири сата, наноси се и трећа облога која се уклања након четири сата, а добијени налаз се оцењује.

Ако се уочи корозивно оштећење коже након било ког од три узастопна излагања испитиваној супстанци, испитивање се након тог излагања прекида. Ако не дође до појаве оштећења на кожи након што се уклони и задња облога, животињу је потребно посматрати још 14 дана, осим уколико раније дође до појаве корозивног оштећења.

У случајевима када се не очекује да ће испитивана супстанца довести до корозивног оштећења коже, али се претпоставља да ће изазвати иритацију, довољно је применити облогу на једну животињу у трајању од четири сата.

1.4.2.4. Испитивање којим се потврђује
(in vivo испитивање иритације коже на додатним животињама)

Ако се у иницијалном испитивању не уочи корозивно оштећење, иритација или негативни налаз коже потребно је, ради потврде, спровести испитивање на још две додатне животиње. На сваку додатну животињу примењује се једна облога током периода излагања у трајању од четири сата. Ако се у иницијалном испитивању уочи иритација коже, испитивање којим се потврђује изводи се по фазама или истовременим излагањем још две додатне животиње. У изузетном случају у коме се иницијално испитивање не изводи, две или три животиње могу се третирати по једном облогом која се уклања након четири сата. Ако се користе две животиње и код њих дође до идентичних налаза, није неопходно даље испитивање. У супротном, потребно је и трећу животињу укључити у испитивање. Сумњиве (двосмислене) налазе понекад је потребно потврдити испитивањима на додатним животињама.

1.4.2.5. Период посматрања

Период посматрања мора да буде довољно дуг како би се у потпуности одредила реверзибилност уочених ефеката. Експеримент се прекида у било ком тренутку ако животиња показује непрекидне знакове јаког бола или патње. Да би се одредила реверзибилност ефеката, потребно је посматрати животиње након уклањања облоге и то до 14 дана. Ако се реверзибилност уочи пре 14 дана, експеримент се прекида.

1.4.2.6. Клиничка посматрања и оцењивање реакција на кожи

Код свих животиње потребно је испитати знакове еритема или едема на кожи и оценити налаз и то након 60 минута, и касније: 24 сата, 48 сати и 72 сата након уклањања облоге. Код иницијалног испитивања на једној животињи, само место испитивања на кожи потребно је прегледати непосредно након уклањања облоге. Реакције на кожи оцењују се и описују према оценама наведеним у Табели. Ако на кожи постоји оштећење које не може да се дефинише као иритација или корозивно оштећење након 72 сата, посматрање се продужава до 14 дана како би се одредила реверзибилност ефеката. Осим посматрања иритације коже, бележе се и описују и сви локални токсични ефекти, попут сушења коже као и системски штетни ефекти (нпр. клинички знакови токсичности или промене у телесној маси). У случају нејасних налаза обављају се хистопатолошка испитивања.

Оцењивање налаза коже по својој природи је субјективно. Како би се подстакло да оцењивање буде усклађено међу различитим лабораторијама, потребно је особље лабораторија адекватно обучити за оцењивање (видети Табелу). Доступан је и илустровани водич за оцењивање иритације коже и других лезија[9].

2. ПОДАЦИ

2.1. НАВОЂЕЊЕ РЕЗУЛТАТА

Резултати испитивања наводе се табеларно у завршном извештају. Резултати садрже све податке наведене у одељку 3.1. ове методе.

2.2. ТУМАЧЕЊЕ РЕЗУЛТАТА

Оцена иритације коже спроводи се у сагласности са природом и тежином оштећења/лезија на кожи, као и са њиховом реверзибилношћу или иреверзибилношћу. Појединачне оцене саме за себе не указују на иритативно својство испитиване хемикалије, будући да се процењују и остали ефекти. Појединачне оцене се имају у виду као препорука, и значајне су само уколико су подржане потпуним описом и проценом свих уочених ефеката.

Код процене иритативног одговора потребно је размотрити реверзибилност оштећења на кожи. Испитивана супстанца може се сматрати иритативном када су налази попут алопеције (на ограниченој површини), хиперкератозе, хиперплазије или десквамације присутни све до краја периода посматрања од 14 дана.

3. ИЗВЕШТАЈ О ИСПИТИВАЊУ

ПИСАЊЕ ИЗВЕШТАЈА

Извештај о испитивању садржи податке о:

1) Разлозима за извођење *in vivo* испитивања:

– анализу квалитета постојећих података, укључујући резултате добијене стратегијом испитивања корак по корак;

– опис релевантних података добијених из претходних испитивања;

– податке из сваког појединачног корака стратегије испитивања;

– опис изведених *in vitro* испитивања, који укључују детаље о поступку и резултате добијене за испитивану/референтну супстанцу;

– анализу квалитета података за извођење *in vivo* студије.

2) Испитиваној супстанци:

– идентификациони подаци (нпр. CAS број; порекло, степен чистоће, познате нечистоће, број серије);

– физичко стање и физичка и хемијска својства (нпр. pH, испарљивост, растворљивост, стабилност);

– код смеше: састав и релативни проценти састојака.

3) Вехикулуму:

– идентификација, концентрација (по потреби), запремина која се користи;

– оправданост избора вехикулума.

4) Експерименталним животињама:

– врста/сој, разлог коришћења друге врсте, а не албино кунића;

– број животиња сваког пола;

– телесна маса појединачних животиња на почетку и крају испитивања;

– старост на почетку испитивања;

– извор животиња, услови смештаја, исхрана итд.

5) Условима испитивања:

– начин припреме коже на месту где се ставља облога;

– детаљи о коришћеним материјалима за облогу, као и начин наношења облоге;

– детаљи о припреми испитиване супстанце, примени и уклањању.

6) Резултатима:

– табеларни приказ оцене налаза иритације/корозивног оштећења коже за сваку животињу при сваком времену посматрања;

– описи свих уочених лезија;

– детаљан опис природе и степена иритације или корозивног оштећења коже, као и хистопатолошки налази;

– опис свих других локалних штетних ефеката (нпр. обезмашћивање коже/сушење) као и системских ефеката.

– тумачење резултата.

4. ЛИТЕРАТУРА

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, 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, 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, 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, pp.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.oecd1.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.oecd1.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.oecd1.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 (Доступно на захтев од секретеријата OECD)

Део други
Оцењивање реакција на кожи

Настанак еритема и есхаре

Нема еритема 0

Веома слаб еритем (једва видљив) 1

Добро дефинисан еритем 2

Средње изражен до јак еритем 3

Јак еритем (црвенило) уз настанак есхаре која спречава оцену еритема 4

Максимална оцена: 4

Настанак едема

Нема едема 0

Веома слаб едем (једва видљив) 1

Слаб едем (јасно ограничен) 2

Средње изражен едем (уздигнут приближно 1 mm) 3

Јак едем (уздигнут изнад 1 mm и проширен и на површину која није била изложена супстанци) 4

Максимална оцена: 4

У случају нејасних налаза потребно је обавити хистопатолошка испитивања.

Део трећи

СТРАТЕГИЈА ИСПИТИВАЊА ИРИТАЦИЈЕ И КОРОЗИВНОГ ОШТЕЋЕЊА КОЖЕ КОРАК ПО КОРАК

1. ОПШТА РАЗМАТРАЊА

У интересу научне заснованости и због добробити животиња важно је избегавати непотребно коришћење животиња или испитивања која ће код животиња вероватно изазвати јак одговор. Пре *in vivo* испитивања иритације/корозивног оштећења потребно је проценити све постојеће податке који се односе на потенцијал испитиване супстанце да изазове иритацију / корозивно оштећење. Испитивање на лабораторијским животињама може да се избегне ако постоји довољно података и доказа за класификацију одређене супстанце у односу на потенцијал да изазове иритацију/корозивно оштећење. На основу анализе квалитета података и стратегије испитивања корак по корак смањиће се потреба за *in vivo* испитивањима, нарочито ако се сумња на могућност да ће испитивана супстанца изазвати интензивне реакције на кожи.

Анализа квалитета података користи се за процену постојећих података о иритацији/корозивном оштећењу коже које изазива испитивана супстанца и да би се утврдило да ли се осим *in vivo* студија на кожи, изводе и додатна испитивања која би допринела да се боље опише овај потенцијал испитиване супстанце. Када се покаже потреба за додатним испитивањима, за прикупљање нових, релевантних експерименталних податка препоручује се примена стратегије испитивања корак по корак. За супстанце које претходно нису испитиване, такође је потребно применити стратегију испитивања корак по корак за одређивање њених ефеката на кожи. Стратегију испитивања описану у овом Делу развили су чланови радне групе OECD[1], а иста је каснија потврђена и проширена у склопу Глобално хармонизованог система за класификацију и обележавање у односу на ефекте по здравље људи и на животну средину, на 28-ом заједничком Симпозијуму хемијске комисије и радне групе за хемију, у новембру 1998. године[2].

Иако стратегија испитивања корак по корак није саставни део методе испитивања B.4. која је дата у овом Делу, она одражава препоручени приступ за одређивање својстава супстанци на основу иритативних/корозивних ефеката на кожи. Ова метода испитивања представља, са аспекта етике и праксе, најбољи приступ за *in vivo* испитивања иритације/крозивног оштећења на кожи. Метода испитивања служи као упутство за извођење *in vivo* испитивања и збраја факторе које је потребно сагледати пре почетка испитивања на животињама. Стратегија такође даје препоруку за процену постојећих података о испитиваној супстанци, као и начин на који је потребно прикупити нове податке за супстанце за које су потребна додатна испитивања или за супстанце за које никаква испитивања нису претходно спроведена. Под одређеним околностима, препоручује се и извођење валидираних и прихваћених *in vitro* или *ex vivo* испитивања иритативних/корозивних ефеката на кожи.

2. ОПИС СТРАТЕГИЈЕ ИСПИТИВАЊА И ПРОЦЕНЕ

Пре почетка испитивања, као део стратегије испитивања корак по корак (видети Слику), процењују се сви доступни подаци како би се одредила потреба за *in vivo* испитивањима на кожи. Иако је значајне податке могуће добити проценом једног параметара (нпр. високи pH), за доношење коначне одлуке о испитивањима разматрају се и сви други доступни подаци, као што су штетни ефекти испитиване супстанце или њених аналога. На крају је потребно изнети и објашњење за донету одлуку. Акценат је на постојећим подацима о испитиваној супстанци добијеним из налаза код људи и испитивања на животињама, и на исходу *in vitro* или *ex vivo* испитивања. Где год је могуће избегава се *in vivo* студије корозивних супстанци за које се унапред зна да су штетне. Фактори који се узимају у обзир у стратегији испитивања укључују:

Процену постојећих података студија добијених на основу налаза код људи и података из испитивања на животињама (корак 1). Прво се разматрају постојећи подаци на основу налаза код људи нпр. клиничке студије, студије након професионалне изложености, прикази случаја; односно из студија на животињама нпр. подаци из испитивања са једном или поновљеним дозама, будући да се добијају подаци који су директно повезани са ефектима на кожи. Није потребно испитивати *in vivo* супстанце за које се поуздано зна да изазивају иритацију/корозивно оштећење коже, као и оне за које постоје докази да немају такве ефекте.

Анализу односа структуре и активности (у даљем тексту: SAR) (корак 2). Разматрају се резултати испитивања структурно сличних супстанци, ако такве постоје. Када довољно доступних података о структурно сличним супстанцама/смешама тих супстанци указују на њихов потенцијал за иритацију/корозивни ефекат, може се претпоставити да ће испитивана супстанца у сличним студијама дати сличне налазе. У таквим случајевима, супстанцу није потребно додатно испитивати. Негативни резултати, односно подаци који указују на изостанак оваквих ефеката, из студије на структурно сличним супстанцама или смешама таквих супстанци, не представљају довољно чврст доказ о нешкодљивости супстанце која је у поступку анализе. Валидирани и прихваћени SAR приступ користи се како би се идентификовао потенцијал за иритативни и корозивни ефекат испитиване супстанце.

Физичка и хемијска својства и хемијску реактивност (корак 3). Супстанце које имају екстремне pH вредности као ≤ 2,0 и ≥ 11,5 могу имати изражене локалне ефекте. Ако је екстремни pH основа за оцењивање потенцијала супстанце да изазове корозивно оштећење коже, разматра се и њена кисело-базна резерва (или пуферски капацитет)[3, 4]. Ако пуферски капацитет указује на то да супстанца не изазива корозивно оштећење коже, неопходно је обавити додатна испитивања како би се потврдила ова претпоставка, и то по могућству применом валидираних и прихваћених *in vitro* или *ex vivo* испитивања (видети кораке 5 и 6).

Дермалну токсичност (корак 4). Ако се показало да је хемикалија веома токсична након дермалне примене, не препоручује се *in vivo* испитивање иритације/корозивног оштећења, будући да ће количина испитиване супстанце која се уобичајено примењује премашити ону веома токсичну дозу, и довести до угинућа или изразите патње животиња. Нису потребна додатна испитивања ако претходно изведена испитивања на албино кунићима применом дозе од 2.000 mg/kg ТМ или веће нису показала никакве штетне ефекте на кожи. Код процене акутне дермалне токсичности потребно је имати на уму неколико ствари: на пример, белешке о лезијама на кожи могу бити непотпуне. Испитивања и опажања могу бити обављена на другој врсти, а не на кунићима, а друге животињске врсте могу битно да се разликују по осетљивости одговора. Облик у којем је испитивана супстанца примењена на кожу можда није одговарајући за одређивање иритације/корозивног оштећења коже (нпр. разблаживање супстанце код испитивања дермалне токсичности[5]). У случајевима када су обављена добро осмишљена испитивања дермалне токсичности на кожи кунића, негативни налази могу да се сматрају довољно чврстим доказом да испитивана супстанца не изазива иритацију/корозивно оштећење коже.

Резултате *in vitro* или *ex vivo* испитивања (кораци 5 и 6). Испитивање на животињама није потребно вршити за супстанце које су показале корозивно или јако иритативно својство у *in vitro* или *ex vivo* испитивањима[6, 7] која су валидирана и прихваћена управо за процену ових специфичних ефеката, већ се може претпоставити да ће ове супстанце довести до сличних ефеката и *in vivo*.

In vivo испитивања на кунићима (кораци 7 и 8). Ако се након процене квалитета постојећих података ипак донесе одлука да се изводи *in vivo* испитивање, иницијално испитивање се започиње само на једној животињи. Ако на тој животињи супстанца изазове корозивно оштећење коже, обустављају се даља испитивања. Ако не дође до корозивног оштећења коже у иницијалном испитивању, потребно је да се иритативни или негативни налаз додатно потврди на још две експерименталне животиње и то за време излагања у трајању од четири сата. Ако се уочи ефекат иритације у иницијалном испитивању, може да се обави испитивање којим се потврђује и то корак по корак, или истовременим излагањем две додатне животиње.

3. ЛИТЕРАТУРА

1. OECD, (1996) Test Guidelines Programme: Final Report on the OECDWorkshop on Harmonisation of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods. Held on Solna, Sweden, 22-24 January 1996 (http://www1.oecd.org/ehs/test/background.htm).

2. OECD, (1998) Harmonised Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, November 1998 (http://www1.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm).

3. Worth, A.P., Fentem J.H., Balls M., Botham P.A., Curren R.D., Earl L.K., Esdaile D.J., Liebsch M., (1998). An Evaluation of the Proposed OECD Testing Strategy for Skin Corrosion. 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. Toxicology *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 Edition ISBN 1-56032-356-6, Chapter 31, p. 411-436.

6. Testing Method B.40.

7. 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. Toxicology *In vitro* 12, p. 483-524.

Део четврти

Испитивање и стратегија процене за иритацију/корозивно оштећење коже

	Активност	Налаз	Закључак
1	Постојећи подаци добијени на основу испитивања код људи/животиња који показују ефекте на кожи или слузокожи	Корозија	Супстанца је корозивна. Даља испитивања нису потребна.
		Иритација	Супстанца је иритативна. Даља испитивања нису потребна.
		Нема корозије/иритације	Супстанца није иритативна/корозивна. Даља испитивања нису потребна.
	Нема доступних података, или су доступни подаци неадекватни		
2	Извршити SAR процену за иритацију/корозивно оштећења коже	Предвиђа се тешко оштећење коже	Супстанца је корозивна. Даља испитивања нису потребна.
		Предвиђа се иритација коже	Супстанца је иритативна. Даља испитивања нису потребна.
	Није могуће предвидети, или су предвиђања негативна и мешана		
3	Одредити pH (по потреби, размотрити пуферски капацитет)	pH ≤ 2 или ≥ 11,5 (са високим пуферским капацитетом, по потреби)	Претпоставља се да је супстанца корозивна. Даља испитивања нису потребна
	2 <pH < 11.5, или pH ≤ 2.0 или ≥ 11.5 са малим / без пуферског капацитета, по потреби		
4	Проценити податке које се односе на системску токсичност путем примене на кожу (1)	Веома токсично	Даља испитивања нису потребна
		Нема корозивног оштећења/иритације при испитивању граничне дозе од 2000 mg/kg TM или веће, код кунића	Сматра се да супстанца није иритативна/корозивна. Даља испитивања нису потребна.
	Подаци нису доступни или се сматрају неадекватним за извођење закључака		
5	Извршити валидирана и прихваћена *in vitro* или *ex vivo* испитивања корозивног оштећења коже	Корозивно за кожу	Претпоставља се корозивно оштећење *in vivo* испитивањима. Даља испитивања нису потребна.
	Супстанца не доводи до корозивног оштећења		
6	Извршити валидирана и прихваћена *in vitro* или *ex vivo* испитивања иритације коже	Иритативно за кожу	Претпоставља се иритација in vivo испитивањима. Претпоставља се корозивно оштећење in vivo испитивањима
	Валидиране in vitro или ex vivo методе испитивања иритације коже још нису развијене или супстанца нема иритативни ефекат		
7	Извршити иницијално *in vivo* испитивање на једном кунићу	Тешко оштећење коже	Супстанца је корозивна. Даља испитивања нису потребна
	Нема тешких оштећења		
8	Обавити на једној или две додатне животиње испитивање којим се потврђује	Корозивно или иритативно	Супстанца је корозивна или иритативна. Даља испитивања нису потребна
		Није корозивно или иритативно	Супстанца није корозивна или иритативна. Даља испитивања нису потребна

(1) може се размотрити при корака 2 и 3.

B.5. АКУТНА ТОКСИЧНОСТ: ИРИТАЦИЈА/ТЕШКО ОШТЕЋЕЊЕ ОКА

Део први

1. МЕТОДА ИСПИТИВАЊА

Ова метода заснива се на Упутству за испитивање OECD 405 (2002).

1.1. УВОД

У припреми ажуриране верзије ове методе испитивања посебна пажња посвећена је могућим побољшањима у односу на добробит животиња, као и на процену свих постојећих података о испитиваној супстанци, са циљем да се избегну непотребна испитивања на животињама. Метода испитивања заснива се на препоруци да се пре *in vivo* испитивања акутног иритативног/корозивног оштећење ока обави анализа квалитета постојећих података[1]. Када нема довољно података, могуће је добити их применом испитивања корак по корак[2, 3]. Стратегија испитивања укључује и обављање валидираних и прихваћених *in vitro* или *ex vivo* испитивања која су описана у Делу трећем ове методе. Пре извођења *in vivo* испитивања ока препоручује се коришћење *in vivo* испитивања иритације/корозивног оштећења коже која могу да предвиде иритацију ока.

У интересу научне заснованости и добробити животиња јесте да се *in vivo* студије започињу након процене свих доступних података који су релевантни за процену потенцијала супстанце да изазове иритацију/тешко оштећење ока. Такви подаци произлазе из претходно добијених налаза код људи односно спроведених испитивања на лабораторијским животињама, из доказа о иритацији /корозивном оштећењу једне или више структурно сличних супстанци или смеша таквих супстанци, али и из података који указују на јаку киселост или базност испитиване супстанце[4, 5], или из претходно већ валидираних и прихваћених *in vitro* или *ex vivo* испитивања иритације/корозивног оштећења коже[6, 6a]. Студије могу да буду спроведене раније или да настану као резултат анализе квалитета постојећих података.

За неке супстанце анализа може да укаже на потребу за *in vivo* испитивањима потенцијала супстанце за иритацију/тешког оштећења ока. У свим таквим случајевима, пре *in vivo* испитивања ефеката на оку, препоручује се *in vivo* испитивање ефеката на кожи у складу са методом испитивања B.4. која је дата у овом Делу[7]. Примена анализе квалитета постојећих података и студије испитивања корак по корак смањује потребу за *in vivo* испитивањима иритације/тешког оштећења ока за супстанце за које постоје довољно података из других студија. Ако потенцијал супстанце да изазове иритацију/тешко оштећење ока не може да се одреди коришћењем методе испитивања корак по корак чак ни након испитивања иритације/корозивног оштећења коже, приступа се *in vivo* испитивању иритације/тешког оштећења ока.

У Делу трећем ове методе описана је стратегија испитивања корак по корак која укључује и обављање валидираних и прихваћених *in vitro* или *ex vivo* испитивања иритације/корозивног оштећења. Стратегију су развили, као јединствено прихваћену и препоручену, чланови радне групе OECD[8], а иста је прихваћена и уврштена у препоручене стратегије испитивања од стране Глобално хармонизованог система за класификацију и обележавање (у даљем тексту: ГХС)[9]. Ова стратегија се препоручује пре било каквих *in vivo* испитивања. За нове супстанце, испитивање корак по корак је препоручени приступ за добијање научно заснованих података о њиховим иритативним/корозивним ефектима. За супстанце које су већ обухваћене испитивањима, иста стратегија се примењује за употпуњавање података о иритативним/корозивним ефектима на око и кожу. Примену другачије стратегије испитивања или поступка, или одлуку да се не примени ова усвојено испитивање корак по корак, потребно је објаснити и образложити.

1.2. ДЕФИНИЦИЈЕ

Иритација ока јесте настанак промена у оку до којих долази након примене испитиване супстанце на спољашњу површину ока, које су потпуно реверзибилне у периоду од 21 дана након примене.

Тешко оштећење ока јесте оштећење ткива ока или озбиљно погоршање вида након примене испитиване супстанце на спољашњу површину ока, које није потпуно реверзибилно у периоду од 21 дана након примене.

1.3. ПРИНЦИП МЕТОДЕ

Супстанца која се испитује примењује се у једној дози у једно око експерименталне животиње. Нетретирано око служи као контрола. Степен иритације/тешког оштећења ока процењује се оцењивањем лезија коњуктиве, рожњаче и дужице, у претходно одређеним временским интервалима. Да би се обезбедила комплетна процена ефеката описују се и друге промене на оку и системски штетни ефекти. Испитивање траје довољно дуго да се процени реверзибилност или иреверзивбилност ефеката.

Животиње које у било ком делу испитивања показују сталне знакове патње односно бола лишавају се живота на хуман начин, а супстанца се процењује у складу са тим. Критеријуми за доношење одлуке о лишавању живота на хуман начин животиња које су на самрти и показују знаке изразите патње, описани су у литератури[10].

1.4. ОПИС МЕТОДЕ

1.4.1. Припрема за *in vivo* испитивање

1.4.1.1. Избор животиња

Препоручује се коришћење здравих младих јединки албино кунића. Уколико се користи друга животињска врста, наводе се разлози за то коришћење.

1.4.1.2. Припрема животиња

Код сваке експерименталне животиње која је претходно одабрана за испитивање прегледају се оба ока 24 сата пре почетка испитивања. Животиње код којих је уочена иритација ока, недостатак или већ постојећа повреда рожњаче не користе се за испитивање.

1.4.1.3. Услови смештаја и исхрана

Животиње се смештају у одговарајући смештај за појединачно и одвојено држање. Температура смештајног простора у коме се држе кунићи одржава се на 20° C (± 3° C). Релативна влажност ваздуха је најмање 30% и да не прелази 70% (осим у случајевима када се просторија са животињама чисти). Идеална влажност је између 50% и 60%. Осветљење је вештачко и то у интервалима од 12 сати светла и 12 сати мрака. Животиње се хране уобичајеном храном за лабораторијске животиње, са слободним приступом води за пиће.

1.4.2. Поступак испитивања

1.4.2.1. Примена испитиване супстанце

Испитивана супстанца примењује се у конјуктивалну кесу једног ока сваке животиње након што се лагано повуче доњи капак очне јабучице. Капци се затим нежно споје на отприлике једну секунду да би се спречио губитак супстанце. Друго око, које није третирано супстанцом, служи за контролу.

1.4.2.2. Испирање

Очи животиња најмање 24 сата од примене не смеју да се испирају, осим ако се примењује чврста супстанца (видети одељак 1.4.2.3.2. ове методе) и у случају непосредног корозивног или иритативног ефекта. Након 24 сата од примене, уколико се процени да је потребно, око може да се испере.

Не препоручује се коришћење пропратне групе животиња за истраживање утицаја који се јављају након испирања,

осим уколико је научно оправдано. Ако је потребно користити пропратну групу животиња, узимају се два кунића. Услови испирања пажљиво се документују, нпр. време испирања, састав и температура течности за испирање; трајање, интензитет и брзина примене.

1.4.2.3. Дозни нивои

1.4.2.3.1. Испитивање течности

За испитивање течности користи се доза испитиване супстанце у запремини од 0,1 mL. За укапавање супстанце директно у око не смеју се користити спрејеви са пумпицом. Течни спреј се истискује и сакупља у бочице пре укапавања 0,1 mL у око.

1.4.2.3.2. Испитивање чврстих супстанци

Када се испитује чврста супстанца, паста, супстанце у облику честица запремина која се користи је 0,1 mL или је то маса која није већа од 100 mg. Испитивана супстанца се уситњава у фини прах. Количина чврсте супстанце мери се након што је пажљиво сабијена и стављена у посуду за мерење. Ако се код првог посматрања које је се обавља један сат након наношења чврсте испитиване супстанце уочи да она није одстрањена из ока животиње помоћу физиолошких механизама, око може се испере физиолошким раствором или дестилованом водом.

1.4.2.3.3. Испитивање аеросола

Препоручује се прикупљање свих спрејева са пумпицом и аеросола пре наношења (укапавања) у око. Изузетак су супстанце у аеросол бочицама под притиском, које се због испаравања не прикупљају унапред. У тим случајевима око се држи отворено и испитивана супстанца се наноси у једном потезу директно у око у трајању око једне секунде, са удаљености од 10 cm. Ова удаљеност може да варира, у зависности од притиска спреја и његовог састава. Води се рачуна да притисак у спреју не оштети око. У неким случајевима, постоји потреба за проценом могућности за „механичко" оштећење ока које су изазвале силе спреја.

Процена дозе испитиване супстанце спреја може се утврдити симулирањем испитивања на следећи начин: супстанца се напрска по папиру за мерење кроз отвор величине ока кунића. Повећање масе папира приближно је дози која је напрскана у око. Код испарљивих супстанци, доза се може утврдити мерењем бочице пре и после прскања испитиване супстанце.

1.4.2.4. Иницијално испитивање
(In vivo испитивање иритације/тешког оштећења ока на једној животињи)

Препоручује се *in vivo* испитивање на једној животињи као што је описано у стратегији испитивања корак по корак (видети Део трећи ове методе).

Ако резултати покажу да супстанца изазива тешко оштећење или јаку иритацију ока при коришћењу прописане методе, не спроводе се даља испитивања на оку.

1.4.2.5. Локални анестетици

Локални анестетици могу да се користе зависно од случаја. Ако анализе квалитета постојећих података указују да супстанца може да изазове бол или иницијално испитивање покаже присуство болних реакција, пре наношења испитиване супстанце може да се употреби локални анестетик. Врста, концентрација и доза локалног анестетика бира се пажљиво, да се спречe одступања у реакцији на испитивану супстанцу због његовог коришћења. Контролно око је такође под локалном анестезијом.

1.4.2.6. Испитивање којим се потврђује
(In vivo испитивање иритације ока на додатним животињама)

Ако у иницијалном испитивању није уочено тешко оштећење ока, иритација или негативан резултат, оно се потврђује коришћењем највише две додатне животиње. Уколико се у иницијалном испитивању уочи значајна иритација која указује да може да се понови јак (иреверзибилан) ефекат и у испитивању којим се потврђује, препоручено је да се испитивање којим се потврђује изводи постепено, прво на једној па на другој животињи, пре него да се испитивање изводи на обе животиње истовремено. Ако друга животиња покаже знакове иритације или тешког оштећења ока, испитивање се не наставља. Додатне животиње могу да буду потребне када се утврђују знакови слабе или средње тешке иритације.

1.4.2.7. Период посматрања

Посматрање траје довољно дуго да би се у потпуности утврдио значај и реверзибилност уочених ефеката. Експеримент се обуставља увек када животиња показује непрекидне знакове бола или патње[9]. Да би се утврдила реверзибилност ефеката, животиње се посматрају 21 дан након примене супстанце. Ако се пре истека 21-ог дана уочи да су ефекти реверзибилни, експеримент се прекида.

1.4.2.7.1. Клиничка посматрања и оцењивање реакција на оку

Преглед очију обавља се након 1 сата, 24 сата, 48 сати и 72 сата од примене супстанце. Животиње се не држе у испитивању након што се добију дефинитивни подаци. Животиње које показују непрекидне знакове јаког бола или патње лишавају се живота на хуман начин без одлагања, а супстанца се процењује у складу са тим. Животиње које се након примене испитиване супстанце лишавају живота на хуман начин могу имати следећа оштећења ока: перфорирана рожњача или јака улцерација рожњаче која обухвата стафилом, крв у предњој комори ока, четврти степен замућења рожњаче који траје 48 сати, недостатак рефлекса на светлост (оцена 2 реакције ириса који траје 72 сат, улцерација мембране коњуктиве,

некроза коњуктиве или мембране са трепавицама или десквамација. Разлог за лишавање живота на хуман начин јесте што су ове лезије (оштећења) углавном трајне.

Животиње код којих се лезије ока не развију, могу да се третирају тек након трећег дана од примене. Животиње са слабим до средње тешким оштећењима посматрају се до уочавања јасне лезије или током 21 дан, након чега се испитивање прекида. Посматрања се обављају 7 дана, 14 дана и 21 дан да би се утврдио обим оштећења и њихова реверзибилност или иреверзибилност.

Оцењивање реакције на оку (коњуктива, рожњача и дужица) се бележи код сваког испитивања (видети Део други ове методе). Наводе се сва друга оштећења ока (панус, пребојеност) и друге промене.

Испитивање реакција врши се уз коришћење бинокуларне лупе, ручне слит-лампе, биомикроскопа или другог одговарајућег прибора. Након бележења резултата посматрања након 24 сата, очи додатно могу да буду прегледане флоуресцентном лампом.

Оцењивање налаза на оку по својој природи је субјективно. Како би се подстакло да оцењивање налаза ока буде усклађено међу различитим лабораторијама, потребно је да се особље лабораторија адекватно обучи за оцењивање и тумачење резултата.

2. ПОДАЦИ

2.1. ПРОЦЕНА РЕЗУЛТАТА

Оцена иритације ока процењује се у складу са природом и тежином лезија и њиховом реверзибилношћу или иреверзибилношћу. Појединачне оцене саме за себе не указују на иритативна својства хемикалије, будући да се процењују и остали ефекти. Појединачне оцене се имају у виду као препорука и значајне су само уколико су подржане потпуним описом и проценом свих уочених ефеката.

3. ИЗВЕШТАЈ О ИСПИТИВАЊУ

3.1. ПИСАЊЕ ИЗВЕШТАЈА

Извештај о испитивању садржи податке о:

1) Разлозима за *in vivo* испитивање:

– анализа процене квалитета постојећих података, укључујући и резултате стратегије испитивања корак по корак

– опис релевантних података добијених из претходних испитивања;

– подаци добијени из сваког корака стратегије испитивања;

– опис *in vitro* изведених испитивања укључујући детаље о поступку и резултате добијене за испитивану/референтну супстанцу;

– опис *in vivo* изведене студије иритације/тешког оштећења ока, укључујући добијене резултате;

– анализа квалитета података за извођење *in vivo* студије.

2) Испитиваној супстанци:

– идентификациони подаци (нпр. CAS број, порекло, чистоћа, познате нечистоће, број серије);

– физичко стање и физичка и хемијска својства (нпр. pH, испарљивост, растворљивост, стабилност, хемијска реакција са водом);

– код смеша: састав и релативни проценти састојака;

– ако се користи локални анестетик: идентификација, чистоћа, тип, доза, евентуална интеракција са супстанцом.

3) Вехикулуму:

– идентификација, концентрација (по потреби), запремина која се користи;

– оправданост за избор вехикулума.

4) Експерименталним животињама:

– врста/сој, разлог за коришћење друге врсте а не албино кунића;

– старост сваке животиње на почетку студије;

– број животиња оба пола у испитивању и контролним групама (по потреби);

– телесна маса појединачних животиња на почетку и крају испитивања;

– извор животиња, услови смештаја, исхрана итд.

5) Резултатима:

– опис методе која је коришћена за оцењивање реакције при сваком времену посматрања (нпр. ручна слит-лампа, биомикроскоп, флуоресцентно светло);

– табеларни приказ налаза иритације/ктешког оштећења за сваку животињу при сваком времену посматрања до уклањања животиње из испитивања;

– опис степена и природе уочене иритације или тешког оштећења;

– опис других уочених лезија на оку (нпр. васкуларизација, формирање пануса, пребојеност, адхезија);

– опис свих локалних ефеката који нису на оку и систематских штетних ефеката, и хистопатолошки налази уколико их има;

– тумачење резултата.

3.2. ТУМАЧЕЊЕ РЕЗУЛТАТА

Резултати студије иритације ока на лабораторијским животињама могу се екстраполирати на људе, и валидни су у ограниченом степену. У многим случајевима албино кунић показује већу осетљивост на иритансе или корозиве ока од човека.

Прецизно се тумаче резултати да би се искључила иритација која је резултат секундарне инфекције.

4. ЛИТЕРАТУРА

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. Toxicollogy *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 Harmonisation 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) Harmonised 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).

Део други
Оцењивање оштећења ока

Рожњача

Замућеност: степен замућености (очитава се налаз са места највеће густине)*

Нема улцерација ни замућења 0

Расуте или дифузне површине замућења (осим незнатног губитка нормалног сјаја);

дужица јасно видљива 1

Лако распознатљива провидна површина;

дужица благо замућена 2

Некротична површина; детаљи дужице нису видљиви ;

величина зеница се једва распознаје 3

Замућење рожњаче; дужица се не распознаје кроз замућење 4

Могући максимум: 4

* Бележи се величина површине замућења рожњаче.

Дужица

Нормална 0

Изразито дубока бора, конгестија, отицање, умерена хиперемија око рожњаче; или надраженост;

дужица реагује на светлост (спора реакција се сматра ефектом) 1

Крварење, обимна деструкција, изостанак реакције на светлост 2

Могући максимум: 2

Коњуктива

Црвенило (односи се на палпебрални и булбарни део коњуктиве; изузев рожњаче и дужице)

Нормална 0

Хиперемија неких капилара 1

Дифузно црвенило (тамно црвена)

појединачни капилари нису јасно видљиви 2

Дифузно црвенило боје меса 3

Могући максимум: 3

Хемоза

Отицање (односи се на капке односно трећи капак)

Нормално 0

Отицање изнад нормале 1

Јасно отицање, са парцијалним увртањем капака 2

Отицање, са капцима затвореним на пола 3

Отицање, са капцима затвореним више од пола 4

Могући максимум: 4

Део трећи

СТРАТЕГИЈА ИСПИТИВАЊА ИРИТАЦИЈЕ И ТЕШКОГ ОШТЕЋЕЊА ОКА КОРАК ПО КОРАК

1. ОПШТА РАЗМАТРАЊА

У интересу научне заснованости и због добробити животиња, важно је избегавати непотребно коришћење животиња или испитивања која ће код животиња вероватно изазвати јак одговор. Пре *in vivo* испитивања иритатације/тешког оштећења ока, потребно је проценити све постојеће податке који се односе на потенцијал испитиване супстанце да изазове иритацију/тешко оштећење ока. Ако постоји довољно података и доказа за класификацију одређене супстанце у односу на потенцијал да изазове иритацију/тешко оштећење ока, може да се избегне испитивање на лабораторијским животињама. На основу анализе квалитета података и стратегије испитивања корак по корак смањиће се потреба за *in vivo* испитивањима, нарочито ако се сумња на могућност да ће испитивана супстанца изазвати интензивне реакције.

Анализа квалитета постојећих податка користи се за процену постојећих података о иритацији/тешком оштећењу ока које изазива испитивана супстанца како би се утврдило да ли је осим *in vivo* испитивања на кожи неопходно обавити и додатна испитивања која доприносе да се боље опише овај потенцијал испитиване супстанце. Када се покаже потреба за додатним испитивањима, за прикупљање нових релевантних експерименталних податка препоручује се примена стратегије испитивања корак по корак. За супстанце које претходно нису испитиване, такође је потребно применити стратегију испитивања корак по корак за одређивање њених ефеката на оку. Стратегију испитивања описану у овом делу развили су чланови радне групе OECD[1], а иста је касније потврђена и проширена у склопу Глобално хармонизованог система за класификацију хемијских супстанци у односу на ефекте по здравље људи и на животну средину, на 28-ом заједничком Симпозијуму хемијске комисије и радне групе за хемију, у новембру 1998. године[2].

Иако ова стратегија испитивања корак по корак није саставни део методе испитивања B.5. која је дата у овом прилогу, она одражава препоручени приступ за одређивање својстава супстанци на основу иритативних/корозивних ефеката на оку.

Са аспекта етике и праксе метода испитивања представља најбољи приступ за *in vivo* испитивања иритације/тешког оштећења на оку. Метода испитивања служи и као упутство за извођење *in vivo* испитивања и збраја факторе које је потребно сагледати пре почетка испитивања на животињама. Стратегија такође даје препоруку за процену постојећих података о испитиваној супстанци као и начин на који је потребно прикупити нове податке за супстанце за које су потребна додатна испитивања или за супстанце за које нису претходно спроведена никаква испитивања. Стратегија као прво укључује извођење валидираног и прихваћеног *in vitro* или *ex vivo* испитивања, а затим методу испитивања B.4. која је дата у овом прилогу иритативних/корозивних ефеката на кожи под специфичним условима[3, 4].

2. ОПИС СТРАТЕГИЈЕ ИСПИТИВАЊА КОРАК ПО КОРАК

Пре почетка испитивања у склопу методе испитивања корак по корак (видети Слику), потребно је проценити постојеће податке како би се одредила потреба за *in vivo* испитивањима на оку. Иако је значајне податке могуће добити проценом једног параметара (нпр. високи pH), за доношење коначне одлуке о испитивањима разматрају се и сви други доступни подаци, као што су штетни ефекти испитиване супстанце или њених аналога. На крају је потребно изнети и објашњење за донету одлуку. Акценат је на постојећим подацима о испитиваној супстанци добијеним из података на основу налаза код људи и испитивања на животињама, и на исходу *in vitro* или *ex vivo* испитивања. *In vivo* студије корозивних супстанци за које се унапред зна да су штетне и избегавају се где год је то могуће. Фактори који се узимају у обзир у стратегији испитивања укључују:

Процену постојећих података добијених на основу налаза код људи и на испитивања код животиња. (корак 1). Прво се разматрају постојећи подаци на основу налаза код људи, нпр. клиничке студије, студије након професионалне изложености, прикази случаја, односно подаци из студија на оку животиња, будући да се добијају подаци који су директно везани за ефекте на око. Процењују се доступни подаци из студија у којима су вршена истраживања иритације/корозивног оштећења на основу налаза код људи односно испитивања код животиња. Супстанце за које је познато да изазивају јаку иритацију/корозивно оштећење ока не смеју се уносити у око животиња, као ни супстанце са истим ефектом на кожи, јер је то сигуран показатељ да су иритативни/корозивни и за око. Супстанце за које има довољно доказа да не изазивају иритацију/тешко оштећење ока у претходно изведеним испитивањима, не испитују се у *in vivo* студијама ока.

Анализу односа структуре и активности (у даљем тексту: SAR) (корак 2). Разматрају се резултати испитивања структурно сличних супстанци, ако су доступни. Када довољно доступних података о структурно сличним супстанцама/смешама тих супстанци указују на њихов потенцијал за иритацију/корозивни ефекат на оку, може се претпоставити да ће испитивана супстанаца дати сличне налазе. У таквим случајевима супстанцу није потребно додатно испитивати. Негативни резултати, односно подаци који указују на изостанак оваквих ефеката из студије на структурно сличним супстанцама или смешама таквих супстанци, не представљају довољно чврст доказ о нешкодљивости супстанце која је у поступку испитивања. Валидирани и прихваћени SAR приступ користи се за идентификацију потенцијала за иритативни и корозивни ефекат испитиване супстанце на оку и кожи.

Физичка и хемијска својства и хемијску реактивност (корак 3). Супстанце које имају екстремне pH вредности као ≤ 2,0 или ≥ 11,5 могу имати изражене локалне ефекте. Ако је екстремни pH основа за оцењивање потенцијала супстанце да изазове тешко оштећење ока, разматра се и њена кисело-базна резерва (или пуферски капацитет)[5, 6]. Ако пуферски капацитет указује на то да супстанца не изазива тешко оштећење ока, неопходно је обавити додатна испитивања како би се потврдила ова претпоставка, и то ако је могуће применом валидираних и прихваћених *in vitro* или *ex vivo* испитивања (видети кораке 5 и 6).

Разматрање осталих постојећих података (корак 4). У овом кораку процењују се сви доступни подаци о системској токсичности код дермалног пута примене. Акутна дермална токсичност испитиване супстанце такође се разматра. Ако се покаже да је испитивана супстанца веома токсична ако се примени на кожу, не постоји потреба за испитивањем на оку, јер ако је веома токсична након дермалног пута примене, може се претпоставити да ће изазвати јаку реакцију ако се нанесе у око. Тај податак такође може да буде размотрен у кораку 2 и 3.

Резултате *in vitro* или *ex vivo* испитивања (корак 5 и 6). Испитивање на животињама није потребно вршити за супстанце које су показале корозивно или јако иритативно својство у *in vitro* или *ex vivo* испитивањима[7, 8] која су валидирана и прихваћена управо за процену иритације/тешког оштећења ока или коже. Може се претпоставити да такве супстанце показују сличне ефекте *in vivo*. Ако не постоје валидирана и прихваћена *in vitro*/*ex vivo* испитивања, корак 5 и 6 се прескачу и директно се приступа кораку 7.

In vivo процену иритације или корозивног оштећења коже (корак 7). Када нема довољно доказа за извођење закључне анализе квалитета података о потенцијалу супстанце да изазове иритацију/тешко оштећење ока на основу поменутих студија, прво се процењује *in vivo* потенцијал иритације/корозивног оштећења коже коришћењем методе испитивања B.4. која је дата у овом Прилогу[4] и Делу трећем датом уз ту методу испитивања[9]. Ако се покаже да супстанца изазива корозивно оштећење или тешку иритацију коже, а не постоје други подаци који доказују супротно, претпоставља се да је супстанца корозивна/иритативна и за око. У том случају нема потребе за извођењем *in vivo* испитивања на оку. Ако супстанца није корозивна/иритативна за кожу, изводи се *in vivo* испитивање на оку.

In vivo испитивање на кунићима (корак 8 и 9). *In vivo* испитивање на оку започиње иницијалним испитивањем коришћењем једне животиње. Није потребно изводити даље испитивање ако резултати испитивања укажу да је супстанца јак иританс или корозив за око. Ако испитивање не покаже никакве значајне реакције, потребно је, са две додатне животиње, извести испитивање којим се потврђује (confoirmatory test).

3. ЛИТЕРАТУРА

1. OECD, (1996) Test Guidelines Programme: Final Report on the OECD Workshop on Harmonisation of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods. Held on Solna, Sweden, 22-24 January 1996

(http://www1.oecd.org/ehs/test/background.htm).

2. OECD, (1998) Harmonised Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, November 1998 (http://www1.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm).

3. Worth, A.P., Fentem J.H., Balls M., Botham P.A., Curren R.D., Earl L.K., Esdaile D.J., Liebsch M., (1998). An Evaluation of the Proposed OECD Testing Strategy for Skin Corrosion. 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. Toxicology *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 Edition ISBN 1-56032-356-6, Chapter 31, p. 411-436.

6. Testing Method B.40.

7. 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. Toxicology *In vitro* 12, p. 483-524.

Део четврти

Испитивање и стратегија процене за иритацију/тешко оштећење ока

	Активност	Налаз	Закључак
1	Постојећи подаци добијени на основу испитивања код људи/животиња који показују ефекте на очима	Тешко оштећење ока	Супстанца је корозивна за око Даља испитивања нису потребна.
		Иритација ока	Супстанца је иритативна за око. Даља испитивања нису потребна.
		Нема тешког оштећења/иритације ока	Супстанца није иритативна/корозивна за око. Даља испитивања нису потребна.
	Постојећи подаци добијени на основу испитивања код људи/животиња који показују корозивне ефекте на кожи	Корозивно оштећење коже	Претпоставља се да је корозивна за око. Даља испитивања нису потребна.
	Постојећи подаци добијени на основу испитивања код људи/животиња који показују јаке иритативне ефекте на кожи	Јака иритација коже	Претпоставља се да је иритативна за око. Даља испитивања нису потребна.
	↓ *Нема доступних података, или су доступни подаци неадекватни*		
2	Извршити SAR процену за иритацију/тешко оштећење ока	Предвиђа се тешко Оштећење ока	Претпоставља се да је супстанца корозивна за око. Даља испитивања нису потребна
		Предвиђа се иритација Ока	Претпоставља се да је супстанца иритативна за око. Даља испитивања нису потребна.
	Извршити SAR процену за корозивно оштећење коже	Предвиђа се корозивно оштећење коже	Претпоставља се да је супстанца корозивна за око. Даља испитивања нису потребна
	↓ *Није могуће предвидети, или су предвиђања негативна и нејасна*		
3	Одредити pH (по потреби, размотрити пуферски	pH ≤ 2 или ≥ 11,5 (са високим пуферским капацитетом, по потреби)	Претпоставља се да је супстанца корозивна за око. Даља испитивања нису потребна
	↓ *2 <pH < 11.5, или pH ≤ 2.0 или ≥ 11.5 са малим / без пуферског капацитета, по потреби*		
4	Проценити податке које се односе на системску токсичност путем примене на кожу	Веома токсично при концентрацијама у којима се испитује на оку	Супстанца би била превише токсична за испитивање. Даља испитивања нису потребна
	↓ *Такви подаци нису доступни или супстанца није веома токсична*		

B.6. СЕНЗИБИЛИЗАЦИЈА КОЖЕ

Део први

1. МЕТОДА ИСПИТИВАЊА

1.1. УВОД

Напомене: Осетљивост и могућност испитивања којим се одређује потенцијал супстанци које изазивају сензибилизацију коже код људи, сматрају се важним у систему класификације на основу токсичности и важни су за јавно здравље.

Не постоји метода испитивања која на одговарајући начин идентификује све супстанце које изазивају преосетљивост коже људи и која је релевантна за све супстанце.

Чиниоци као што су физичка својства супстанце, укључујући њихову способност продирања у кожу, узимају се у обзир при избору одговарајуће методе испитивања.

Развијене су две врсте метода испитивања у којима се користе заморци: методе испитивања са адјувансом у којима се алергијска реакција изазива растварањем или суспендовањем испитиване супстанце „Фројндовом комплетном адјувансу" (у даљем тексту: FCA), и методе испитивања без адјуванса.

Методе испитивања са адјувансом су вероватно тачније у предвиђању да супстанца код људи изазива сензибилизацију коже, за разлику од метода испитивања које не користе FCA. Због овога се препоручују методе испитивања са адјувансом.

Тест максимизације на заморцима (The Guinea-Pig Maximisation Test, у даљем тексту: GMPT) је опште прихваћен тест са адјувансом. За откривање потенцијала изазивања преосетљивости неке супстанце може се користити неколико различитих

метода испитивања, али се препоручује GMPT метода испитивања са адјувансом.

У случају већине класа хемикалија, експерименталне методе испитивања без адјуванса (предност се даје Buehler тесту) сматрају се мање осетљивим.

У одређеним случајевима постоји оправдан разлог за примену Buehler теста у коме се испитивана супстанца примењује топикално, а не у облику интрадермалне ињекције, као што је случај у GMPT. За коришћење Buehler теста, потребно је дати и научно засновано образложење.

GMPT и Buehler тест дати су у овој методи испитивања. Остале методе испитивања користе се ако су претходно потврђене и ако је њихово коришћење научно оправдано.

Ако се у скрининг тесту добије позитиван резултат, испитивана супстанца се означава као потенцијални узрочник сензибилизације. У том случају не настављају се даља испитивања на заморцима. Ако се у скрининг тесту добије негативан резултат, испитивање на заморцима се спроводи користећи поступке дате у овој методи.

Видети Општи увод.

1.2. ДЕФИНИЦИЈЕ

Сензибилизација коже (Алергијски контактни дерматитис) јесте имунолошки посредована, кожна реакција на одређену супстанцу. Код људи одговор може бити окарактерисан сврабом, црвенилом, отоком, папулама (бубуљицама), везикулама (мехурићима), булама (пликовима) или њиховом комбинацијом. Код других врста реакције се могу разликовати, и могу се јавити само еритем или едем.

Индукција јесте експериментално излагање јединке испитиваној супстанци са намером изазивања реакције преосетљивости.

Фаза индукције јесте временски период у трајању од најмање недељу дана након индукције током којег долази до развоја реакције преосетљивости.

Провокације јесу поновљено излагање испитиваној супстанци претходно третиране животиње након фазе индукције како би се одредило да ли јединка развија преосетљивост.

1.3. РЕФЕРЕНТНЕ СУПСТАНЦЕ

Осетљивост и поузданост експерименталне методе испитивања која се користи проверава се сваких шест месеци применом супстанци за које је познато да имају својство благе до средње сензибилизације коже.

У добро обављеном испитивању, позитиван одговор од најмање 30% код методе испитивања са адјувансом или 15% код методе испитивања без адјуванса очекује се за супстанце које изазивају слабу до умерену сензибилизацију.

Препоручују се следеће супстанце:

Табела 1.

CAS број	EINECS број	EINECS називи	Уобичајени називи
101 -86 -0	202 -983-3	α-хексилцинамалдехид	α-хексилцинамалдехид
149 -30 -4	205 -736-8	бензотиазол-2-тиол	каптакс
94-09-7	202 -303-5	бензокаин	норкаин

Постоје околности у којима се могу користити друге контролне супстанце које задовољавају наведене критеријуме, ако се наведе адекватно оправдање за њихову употребу.

1.4. ПРИНЦИП МЕТОДЕ ИСПИТИВАЊА

Испитиване животиње почетно се излажу испитиваној супстанци путем интрадермалних ињекција односно епидермалном применом (индукција). Након периода паузе у трајању од 10 до 14 дана (након фазе индукције), током кога може доћи до развоја имунолошког одговора, животиње се излажу другој, поновљеној дози. Степен проузроковане реакције на кожи након провокације код експерименталних животиња пореди се са оном реакцијом код животиња из контролне групе које су биле подвргнуте лажном третману индукције, и које су биле подвргнуте провокацији.

1.5. ОПИС МЕТОДЕ ИСПИТИВАЊА

Ако је потребно уклањање испитиване супстанце, она се уклања помоћу воде или одговарајућег растварача тако да се не утиче на налаз на кожи или да се не наруши интегритет епидермиса.

1.5.1. Тест максимизације на заморцима (GMPT)

1.5.1.1. Припрема

Здрави, млади албино заморци држе се ради привикавања најмање пет дана пре почетка испитивања у експерименталним условима. Пре испитивања, случајним избором животиња, формирају се групе за третман. Уклањање длаке са коже животиња врши се шишањем, бријањем или хемијском депилацијом, у зависности од примењене методе испитивања.

Пази се да у процедури не дође до оштећења коже. Телесна маса животиња мери се пре почетка испитивања и на крају испитивања.

1.5.1.2. Услови испитивања

1.5.1.2.1. Експерименталне животиње

Користе се уобичајене врсте албино замораца.

1.5.1.2.2. Број и пол

Користе се мужјаци или женке. Ако се користе женке, испитивање се врши на женкама које нису раније рађале и које нису гравидне.

Минимум 10 животиња користи се у третираној групи и најмање 5 животиња у контролној групи. Када се користи мање од 20 третираних и 10 контролних замораца, и када није могуће закључити да ли испитивана супстанца доводи до сензибилизације, препоручује се испитивање на додатним животињама како би се достигао укупан број од најмање 20 третираних и 10 контролних животиња.

1.5.1.2.3. Дозни нивои

Концентрацију испитиване супстанце која се користи за индукцију животиње треба добро да подносе у смислу системских ефеката, и треба да буде највећа могућа доза које ће довести до слабе или средње изражене иритације коже. Концентрација која се користи за провокацију треба да буде највећа могућа која не доводи до иритације коже. Одговарајуће концентрације најбоље је одредити у пилот испитивању на две или три животиње, ако други подаци нису доступни. У ову сврху, може се размотрити и коришћење FCA-третираних животиња.

1.5.1.3. Поступак

1.5.1.3.1. Индукција

Дан 0 – третирана група:

Три пара интрадермалних ињекција запремине 0,1 mL дају се у подручју раменог региона које је претходно обријано тако да се по једна ињекција примени са сваке стране тела.

Ињекција 1: 1:1 смеша (v/v) FCA/вода или физиолошки раствор.

Ињекција 2: испитивана супстанца у одређеној концентрацији у одговарајућем вехикулуму.

Ињекција 3: испитивана супстанца у одређеној концентрацији припремљена као 1:1 смеша (v/v) FCA/вода или физиолошки раствор.

У ињекцији 3 супстанце растворљиве у води растварају се у воденој фази пре мешања са FCA. Супстанце растворљиве у липидној фази или потпуно нерастворне суспендују се у FCA пре мешања са воденом фазом. Завршна концентрација испитиване супстанце мора бити једнака оној коришћеној у ињекцији 2.

Ињекције 1 и 2 дају се једна поред друге близу главе, док се ињекција 3 даје у ивични део испитиване површине.

Дан 0 – контролна група:

Три пара интрадермалних ињекција запремине 0,1mL дају се у исто подручје као код третираних животиња.

Ињекција 1: 1:1 смеша (v/v) FCA/вода или физиолошки раствор.

Ињекција 2: неразређено помоћно средство.

Ињекција 3: 50% m/v формулација вехикулума у 1:1 смеши (v/v) FCA/вода или физиолошки раствор.

Дан 5–7 – третиране и контролне групе:

Ако испитивана супстанца није иританс, након шишања односно бријања и то отприлике 24 сата пре топикалне примене, на површину коже наноси се 0,5 mL 10% натријум лаурил сулфата у вазелину, како би се изазвала локална иритација коже.

Дан 6–8 – третирана група:

Са третираног дела коже поново се уклања длака. На филтер папир величине 2 cm x 4 cm нанесе се у дебелом слоју испитивана супстанца растворена у одговарајућем вехикулуму и држи у контакту са кожом уз помоћ оклузивног завоја наредних 48 сати. Избор вехикулума потребно је образложити. Чврсте супстанце се пре примене уситне до праха и суспендују у одговарајућем вехикулуму. Течности се могу применити и неразблажене.

Дан 6–8 – контролна група:

Са површине коже која се поновно третира уклања се длака. Затим се само вехикулум, без испитиване супстанце, наноси на кожу уз помоћ оклузивног завоја и држи у контакту са кожом наредних 48 сати.

1.5.1.3.2. Провокација

Дан 20–22 – третиране и контролне групе:

Са бокова животиња из третираних и контролних група уклања се длака. На један бок сваке животиње наноси се облога добро натопљена испитиваном супстанцом, а на други бок облога натопљена вехикулумом. Облоге се држе у контакту са кожом наредна 24 сата помоћу оклузивног завоја.

1.5.1.3.3. Посматрања и оцењивање: третиране и контролне групе

Приближно 21 сат након уклањања облога са места провокације, кожа на том месту се, по потреби, чисти и поново брија или депилира.

Приближно 3 сата касније (48 сати од почетка провокације) посматрају се реакције на кожи и оцењују према критеријумима и оценама датим у Делу другом ове методе.

Приближно 24 сата након прве оцене (након укупно 72 сата) обавља се и друго посматрање реакција на кожи и бележи се оцена.

Препоручује се насумично оцењивање животиња из третираних и контролних група.

Ако је потребно појаснити резултате добијене након прве провокације, може се обавити и друга провокација, и то након приближно недељу дана, са одговарајућом новом контролном групом. Друга провокација може се обавити и на животињама из оригиналне контролне групе. Све реакције на кожи као и неуобичајени налази, укључујући системске реакције, који су последица индукције или провокације испитиваном супстанцом бележе се и оцењују према Magnusson/Kligman скали (видети Део други ове методе). Други поступци, као што су хистопатолошка испитивања, мерења дебљине коже и сл., могу се обавити како би се разјасниле недовољно јасне реакције.

1.5.2. Buehler тест

1.5.2.1. Припрема

Здрави, млади албино заморци држе се ради привикавања најмање пет дана пре почетка испитивања у експерименталним условима. Пре испитивања, насумичним избором, животиње се разврставају у групе за третман. Уклањање длаке са коже животиња врши се шишањем, бријањем или хемијском депилацијом, у зависности од примењене методе испитивања. Пази се да не дође до оштећења коже. Телесна маса животиња мери се пре почетка испитивања и на крају испитивања.

1.5.2.2. Услови испитивања

1.5.2.2.1. Експерименталне животиње

Користе се већ уобичајене врсте албино замораца.

1.5.2.2.2. Број и пол

Користе се мужјаци или женке. Ако се користе женке, испитивање се врши на женкама које нису раније рађале и које нису гравидне.

Минимум 20 животиња користи се у третираној групи и најмање 10 животиња у контролној групи.

1.5.2.2.3. Дозни нивои

Концентрација испитиване супстанце која се користи при индукцији мора бити највећа могућа која ће проузроковати благу, али не прекомерну иритацију коже. Концентрација која се користи за провокацију мора бити највећа концентрација која не изазива иритацију коже. Ако је потребно, одговарајућа концентрација може се одредити из пробног испитивања на две или три животиње.

У случају испитиваних супстанци које су растворљиве у води, најбоље је користити воду или разблажени ненадражујући сурфактант као вехикулум. У случају других испитиваних супстанци за индукцију препоручује се коришћење смеше 80% етанол/вода, а за провокацију ацетон.

1.5.2.3. Поступак

1.5.2.3.1. Индукција

Дан 0 – третирана група:

Са једног бока животиње шишањем се уклања длака. Систем „patch" теста се припрема са испитиваном супстанцом растворeном у одговарајућем вехикуклуму (избор вехикулума потребно је образложити; испитиване супстанце у течном стању могу се применити и неразблажене).

„Patch" систем са испитиваном супстанцом примењује се на површину коже уз помоћ оклузивног завоја и држи у контакту с кожом наредних 6 сати.

У овој врсти испитивања користи се оклузивни завој, а као облога може послужити округао или квадратни комадић памучне газе, површине 4 cm^2–6 cm^2. Како би се спречило да животиња скине облогу, може се на место примене ставити одговарајућа препрека или додатни завој. У случају коришћења додатног завоја, можда ће бити потребно поновити третман.

Дан 0 – контролна група:

Са једног бока животиње брија се кожа. На облогу се наноси само вехикулум које се потом помоћу завоја држи у контакту са кожом наредних 6 сати, као и у случају животиња из испитиване групе.

Дани 6–8 и 13–15 – третиране и контролне групе:

На дане 6–8 и 13–15 примена испитиване супстанце обавља се на истом месту на боку животиње као и на дан 0 (по потреби, длака се поновно уклања).

1.5.2.3.2. Провокација

Дани 27–29 – третиране и контролне групе:

Са нетретираног бока животиња из испитиване и контролне групе бријањем се уклања длака. На тако припремљен део коже ставља се оклузивни завој са облогом на који је претходно нанета одговарајућа количина испитиване супстанце у највећој могућој концентрацији која неће изазвати иритацију коже.

Када је неопходно, оклузивни завој који садржи само вехикулум такође се наноси на кожу нетретираног бока животиња из испитиване и контролне групе. Облоге се држе у контакту с кожом наредних 6 сати.

1.5.2.3.3. Посматрање и степеновање

Приближно 21 сат након уклањања облоге са места провокације уклања се длака са коже на том месту.

Приближно 3 сата касније (тј. приближно 30 сати након провокације) посматрају се реакције на кожи и оцењују према критеријумима и оценама датим у Делу другом ове методе.

Отприлике 24 сата након прве оцене (приближно 54 сата након провокације) обавља се и друго посматрање реакција на кожи, и бележе оцене.

Препоручује се насумично оцењивање животиња из третираних и контролних група.

Ако је потребно додатно појаснити резултате добијене након прве провокације, обавља се и друга провокација, и то након приближно недељу дана, са одговарајућом новом контролном групом.

Друга провокација може се обавити и на животињама из оригиналне контролне групе

Све реакције на кожи као и неуобичајени налази, укључујући системске реакције које су последица индукције или провокације испитиваном супстанцом бележе се и оцењују према Magnusson/Kligman скали (видети Део други ове методе). Други поступци, као што су хистопатолошка испитивања, мерења дебљине коже и сл., могу се обавити како би се објасниле недовољно јасне реакције.

2. ПОДАЦИ (GPMT и Buehler тест)

Подаци се приказују табеларно. За сваку животињу наводе се уочене реакције на кожи при сваком посматрању.

3. ИЗВЕШТАЈ О ИСПИТИВАЊУ (GPMT и Buehler тест)

Ако се скрининг испитивање обавља пре испитивања на заморцима, даје се опис обављеног испитивања или се позива на препоруку (Mouse Ear Swelling Test, MEST) и износе се детаљи поступка заједно са резултатима добијеним у склопу испитивања обављених са испитиваном и референтном супстанцом.

Писање извештаја (GPMT и Buehler тест)

Извештај о испитивању садржи:

1. Податке о експерименталним животињама:

– сој замораца;

– број, старост и пол животиња;

– порекло, услове смештаја, исхране, итд.;

– телесну масу појединачних животиња на почетку испитивања.

2. Податке о условима испитивања:

– начин припреме коже;

– детаљан опис припреме фластера и облога;

– резултате пробног испитивања са закључком о концентрацијама које ће се користити за индукцију и провокацију;

– детаље припреме испитиване супстанце, њене примене на кожу и уклањања;

– образложење за избор вехикулума;

– концентрације испитиване супстанце и вехикулума за индукцију и провокацију, као и укупну количину примењене испитиване супстанце у индукцији и провокацији.

3. Резултате:

– кратак преглед резултата посљедњег испитивања сензибилизације и поузданости (видети одељак 1.3. ове методе) укључујући податке о испитиваној супстанци, концентрацији и вехикулуму;

– појединачно приказане за сваку животињу укључујући и систем оцењивања;

– опис врсте и степена озбиљности уочених ефеката на кожи;

– све хистопатолошке налазе.

4. Тумачење резултата.

5. Закључке.

4. ЛИТЕРАТУРА

Ова метода испитивања заснива се на Упутству за испитивање OECD TG 406.

Део други
Magnusson/Kligman скала за оцену реакција услед провокације испитиваном супстанцом „patch" тестом

0 нема видљивих промена

1 дискретан или местимичан (нехомоген) еритем

2 средње изражен и раширен еритем

3 изражен еритем и оток

B.7. АКУТНА (ОРАЛНА) ТОКСИЧНОСТ (28 ДАНА)
– ПОНОВЉЕНЕ ДОЗЕ

1. МЕТОДА ИСПИТИВАЊА

1.1. УВОД

Видети Општи увод.

1.2. ДЕФИНИЦИЈЕ

Видети Општи увод.

1.3. ПРИНЦИП МЕТОДЕ ИСПИТИВАЊА

Испитивана супстанца примењује се перорално у растућим дозама на неколико различитих група експерименталних животиња. На једну групу животиња примењује се једна доза током 28 дана. Током примене испитиване супстанце животиње се посматрају свакодневно како би се забележили знакови токсичности. Животиње које угину током испитивања подвргавају се постморталном прегледу, а на крају експеримента и преживеле животиње се лишавају живота на хуман начин и подвргавају постморталном прегледу.

Ова метода испитивања ставља већи нагласак на неуролошке ефекте и потребу за пажљивим клиничким посматрањем животиња како би се прикупило што више података. Метода испитивања је развијена како би омогућила идентификацију хемикалија с неуротоксичним потенцијалом, које захтевају додатна испитивања овог аспекта. Поред тога, метода испитивања може указивати и на имунолошке ефекте испитиване супстанце као и на токсичност по репродукцију.

1.4. ОПИС МЕТОДЕ ИСПИТИВАЊА

1.4.1. Припрема

Здраве младе одрасле јединке насумично се групишу у испитиване и контролну групу. Кавези су такви да се могући ефекти смештаја сведу на минимум. Животиње се обележавају и држе у кавезима најмање пет дана пре почетка испитивања како би се прилагодиле на лабораторијске услове.

Испитивана супстанца дозира се или путем хране или путем воде за пиће или директно, сондом у желудац. Метода оралне примене зависи од циља студије и од физичко-хемијских својстава супстанце.

Када је потребно испитивана супстанца се раствара или суспендује у одговарајућем вехикулуму. Препоручује се, кад год је могуће, примена воденог раствора/суспензије, а тек затим раствора или емулзије у уљу (нпр. кукурузном уљу) или неком другом средству. Ако се користи вехикулум које није вода, код тумачења резултата узимају се у обзир и потенцијални токсични ефекти тог вехикулума. Потребно је одредити и стабилност испитиване супстанце у вехикулуму.

1.4.2. Услови испитивања

1.4.2.1. Експериментална животиње

Препоручује се коришћење младих, здравих пацова и то сојева који се најчешће користе у лабораторијским експериментима. Могуће је користити и друге глодаре. Испитивање се врши на женкама које нису раније рађале и које нису гравидне. Дозирање је најбоље започети одмах након престанка сисања, а у сваком случају пре него што животиње наврше девет недеља.

На почетку испитивања распон телесних маса појединачних животиња не треба да прелази ± 20% од средње вредности за сваки пол.

Када се испитивање са поновљеним оралним дозама обавља као претходно за дугорочне студије, животиње истог соја и из истог извора користе се у оба испитивања.

1.4.2.2. Број и пол

Најмање 10 животиња (пет женки и пет мужјака) користи се за сваки дозни ниво. Ако се у току експеримента планирају привремена лишавања живота на хуман начин, број животиња у експерименту повећава се за број који се планира да се лиши живота у току испитивања.

Додатно, пратећа група од 10 животиња (по пет сваког пола) може се излагати високим дозама испитиване супстанце у периоду од 28 дана, како би се 14 дана након третмана забележила реверзибилност, постојаност или одложена појава токсичних ефеката. Потребно је укључити и групу од 10 контролних животиња (поново по пет животиња сваког пола).

1.4.2.3. Дозни нивои

Користите се најмање три третиране групе, заједно са истовременом контролном групом. Осим што се животињама у контролним групама не даје испитивана супстанца, са животињама се поступа идентично као са животињама из третираних група. Ако је коришћен вехикулум, контролна група добија вехикулум у највећој коришћеној запремини.

Ако се проценом постојећих података, за испитивану супстанцу у концентрацији од 1.000 mg/kg TM/дан, не очекују никакви ефекти, препоручује се обављање испитивања граничне дозе. Ако не постоје одговарајући подаци за такву процену, може се спровести испитивање са циљем одређивања доза које ће се применити.

Дозе испитиване супстанце бирају се узимајући у обзир токсиколошке или токсикокинетичке податке који већ постоје за испитивану супстанцу или структурно сличне супстанце. Највећа доза бира се тако да изазове токсични ефекат, али не и смрт или тешку патњу животиња. Потом се редом бирају опадајуће концентрације са циљем демонстрирања ефеката везаних за примењену дозу све док се не дође до дозе без штетног ефекта, тј. „no-observed-adverse-effects-level” (NOAEL). Дозе се смањују прогресивно за фактор два до четири пута, а додатак четврте испитиване дозе препоручује се уместо коришћења веома великих интервала (нпр. већих од фактора 10) између доза.

За супстанце које се дозирају путем хране или воде за пиће, важно је претходно проверити да количина испитиване супстанце додата у оброк не утиче штетно на исхрану или равнотежу воде. Када се испитивана супстанца додаје храни, она се примењује или у константној концентрацији (ppm) или у константној дози израженој у јединицама по телесној маси животиње. У сваком случају потребно је прописати одабрани начин дозирања. Ако се супстанца примењује путем сонде у желудац, дозирање се обавља приближно у исто време сваки дан, и подешава се по потреби како би се одржао константан дозни ниво у односу на телесну масу животиње.

Када се испитивање са поновљеном дозом обавља као претходно за дуготрајне студије, потребно је у оба испитивања користити сличну исхрану.

1.4.2.4. Испитивање граничне дозе

Ако испитивање дозе од 1.000 mg/kg TM/дан, или еквивалентне дозе у случају примене путем воде за пиће или хране (прерачунато из вредности за телесну масу) не доводи ни до каквих токсичних ефеката, и ако се токсични ефекти не очекују из података за структурно сличне супстанце, није потребно обавити комплетно испитивање са све три дозе. Испитивање граничне дозе примењује се у свим случајевима, осим у оним где предвиђена изложеност испитиваној супстанци код људи не захтева примену веће дозе.

1.4.2.5. Време посматрања

Време посматрања је 28 дана. Животиње из пратеће групе које су предвиђене за накнадна посматрања задржавају се још најмање додатних 14 дана без третмана како би се уочила постојаност токсичних ефеката, одложена појава ефеката или опоравак од истих.

1.4.3. Поступак

Животиње се дозирају са испитиваном супстанцом сваки дан, седам дана у недељи, током периода од 28 дана, а примена петодневног режима дозирања додатно се образлаже. У случају дозирања путем сонде, испитивана супстанца се примењује у једној дози директно у желудац, након интубирања. Максимална запремина течности који се може у једном дозирању применити зависи од величине експерименталне животиње. Запремина не сме да пређе 1 mL/100 g TM животиње, изузев у случајевима кад се користе водени раствори и када је дозвољено применити 2 mL/100 g TM животиње. Варирање запремине испитиване супстанце потребно је минимизирати прилагођавањем концентрације за сваку дозу, како би се обезбедила примена истих запремина при свим дозним нивоима.

1.4.3.1. Општа посматрања

Клиничка посматрања животиња обављају се најмање једном дневно, ако је могуће у исто време сваког дана узимајући у

обзир очекивано време максималног ефекта након дозирања. Бележи се и здравствено стање животиња. Најмање два пута дневно води се белешка о смртности или животињама на самрти. Животиње на самрти или животиње које трпе изразиту патњу и бол уклањају се из даљег испитивања лишавањем живота на хуман начин, и подвргавају се постморталном прегледу.

Једанпут пре иницијалног излагања испитиваној супстанци (како би се омогућило поређење унутар групе животиња), и најмање једном недељно након тога, обављају се детаљна клиничка посматрања свих животиња. Ова посматрања најбоље је обавити изван кавеза у коме се животиња иначе налази, и, ако је могуће, сваки пут у исто време. Налази се пажљиво бележе и помоћу система оцењивања који је дефинисала лабораторија која врши испитивања. Промене у условима испитивања треба да буду минималне, а налазе да бележе објективни посматрачи који нису упућени у детаље испитивања на животињама. Бележе се промене на кожи, крзну, очима, слузници, као и појава секрета/излучевина и обележја аутономне активности (нпр. сужење, пилоерекција, величина зенице, неуобичајен начин дисања). Потребно је посматрати и промене у ходу, држању или промене узроковане руковањем животињама, као и присутност тоничко-клоничних покрета и стереотипног понашања (нпр. претерано чишћење, ходање у круг) или бизарног понашања (нпр. самоповређивање, ходање уназад).

У четвртој недељи излагања испитиваној супстанци утврђује се реаговање животиња на спољне надражаје различите природе (нпр. аудиторне, визуелне, проприоцептивне), процену јачине стиска, и моторну активност. Детаљи о препорученим поступцима дати су у литератури (видети Општи увод).

Функционална посматрања обављена у четвртој недељи излагања могу се избећи кад се испитивање обавља као претходна студија субхроничном (90-дневном) испитивању. У том случају, функционална посматрања могу бити део овог дуготрајнијег испитивања. С друге стране, доступност података о функционалним посматрањима изведених из испитивања са понављаним дозама омогућава лакши избор доза за накнадно субхронично испитивање.

Изузетно, функционална посматрања се могу избећи код оних група животиња које показују знакове токсичности у мери која значајно омета обављање функционалног испитивања.

1.4.3.2. Телесна маса и потрошња хране/воде

Телесна маса свих животиња мери се најмање једном недељно. Потрошња хране и воде бележи се најмање једном недељно. Ако се испитивана супстанца даје путем воде за пиће, води се евиденција о потрошњи воде и то најмање једанпут недељно.

1.4.3.3. Хематолошка испитивања

На крају испитивања потребно је урадити следећа хематолошка испитивања: одредити хематокрит, концентрацију хемоглобина, број еритроцита, број укупних и диференцираних леукоцита, број тромбоцита, као и коагулабилност.

Узорци крви узимају се са одређеног места непосредно пре или за време лишавања живота на хуман начин, и чувају под одговарајућим условима.

1.4.3.4. Клиничко-биохемијска испитивања

Клиничко-биохемијска испитивања крви обављају се са циљем испитивања токсичних ефеката у ткивима, посебно у јетри и бубрезима, и то на узорцима крви свих експерименталних животиња непосредно пре или за време лишавања живота на хуман начин (осим оних које су већ пронађене мртве или које су лишене живота на хуман начин у међувремену). Пре узимања узорака крви[I] препоручује се ускраћивање хране животињама преко ноћи. Испитивања у плазми или серуму укључују и одређивање натријума, калијума, глукозе, укупног холестерола, урее, креатинина, укупних протеина и албумина, и активности најмање два ензима као индикатора хепатоцелуларних ефеката (као што су: аланин аминотрансфераза, аспартат аминотрансфераза, алкална фосфатаза, гама глутамил транспептидаза и сорбитол дехидрогеназа). Могу се обавити и мерења активности других ензима (ензими јетре или неког другог порекла) као и жучних киселина што може под одређеним околностима обезбедити корисне информације.

Необавезно, током последње недеље испитивања, могу се обавити и следећи прегледи урина сакупљеног у одређеном времену: одредити изглед, запремину, осмолалност или специфичну густину, pH, протеине, глукозу и присутност крви/крвних ћелија у урину.

Разматра се могућност одређивања серумских маркера који указују на опште оштећење ткива. Ако се сумња да испитивана супстанца делује на метаболичке процесе, обављају се и друга одређивања, као што су одређивање концентрације калцијума, фосфора, триглицерида, нивоа специфичних хормона, метхемоглобина, и активност холинестеразе. Сви ови параметри одређују се при испитивању хемикалија из одређених класа, тј. у одређеним случајевима.

Препоручује се флексибилан приступ који зависи од врсте испитиване животиње односно очекиваног ефекта дате супстанце.

Ако не постоје адекватни подаци о контролним вредностима параметара из претходних испитивања, разматра се потреба за одређивањем хематолошких и клиничко-биохемијских параметара и пре него што се започне са дозирањем испитиване супстанце.

_____

I За одређивање бројних параметара из серума и плазме, а највише за одређивање глукозе, препоручује се гладовање преко ноћи. Главни разлог томе је значајно већа варијација вредности као последица узимања хране која би могла да маскира суптилне ефекте и отежа тумачење резултата. С друге стране, гладовање преко ноћи може утицати на општи метаболизам животиња и, посебно у случају давања испитиване супстанце путем хране, пореметити дневну изложеност испитиваној супстанци. Ако се усвоји гладовање преко ноћи, клиничко-биохемијска испитивања потребно је обавити након извођења функционалних посматрања у четвртој недељи

испитивања.

1.4.3.5. Постмортални преглед

Све животиње које се користе у испитивању подвргавају се детаљном постморталном прегледу, која укључује пажљив преглед спољашње површине тела, укључујући све отворе, лобању, грудну и трбушну дупљу. Јетру, бубреге, надбубрежне жлезде, тестисе, семенике, тимус, слезену, мозак и срце свих животиња потребно је одвојити од околног ткива, и што је пре могуће, влажне измерити одмах након секције како би се избегло сушење.

Следеће врсте ткива чувају се у медијуму за фиксирање ради накнадног извођења хистопатолошких прегледа: сва видљиво оштећена ткива, мозак (репрезентативне регије, укључујући велики мозак, мали мозак и продужену мождину), кичмена мождина, желудац, танко и дебело црево (укључујући Пајерове плоче), јетра, бубрези, надбубрежне жлезде, слезина, срце, тимус, штитна жлезда, душник, плућа (убризгавањем фиксатора па потом урањањем у исти медијум), полне жлезде, помоћни полни органи (нпр. материца, простата), мокраћна бешика, лимфни чворови (по могућности, један узет са пута уноса испитиване супстанце у организам, и други, удаљен од њега како би се проучили системски ефекти), периферни нерв (n. ischiadicus или n. tibialis), по могућству смештен уз сам мишић, и исечак костне сржи (или свеж аспират костне сржи). Клинички и други налази могу упутити на потребу за испитивањем и других ткива. Чувају се и сви органи који се на основу сазнања о својствима испитиване супстанце сматрају циљним.

1.4.3.6. Хистопатолошка испитивања

Комплетна хистопатолошка испитивања обављају се на сачуваним органима и ткивима свих животиња из контролне групе, и групе изложене високој дози испитиване супстанце. Ако се примете промене код животиња на које је примењена висока доза испитиване супстанце, хистопатолошка испитивања се обављају и на животињама из свих осталих група.

Испитују се све веће (макроскопски видљиве) лезије.

Ако је коришћена помоћна група, хистопатолошкој обради се подвргавају ткива и органи на којима су се код третираних животиња приметиле неке промене.

2. ПОДАЦИ

За сваку животињу воде се посебни подаци. Подаци се приказују табеларно где се за сваку испитивану групу животиња наводи број животиња на почетку испитивања, број животиња које су угинуле или су лишене живота на хуман начин за време испитивања (заједно са временом лишавања живота), као и број животиња код којих су пронађени знакови токсичности. Даје се и детаљан опис уочених знакова токсичности, време када су примећени, њихово време трајања и степен израженості, као и број животиња код којих су примећене лезије заједно са описом типа лезија и процентом животиња код којих су пронађене.

Када је могуће, сви резултати се анализирају помоћу одговарајуће статистичке методе, коју је најбоље одабрати још у време планирања испитивања.

3. ИЗВЕШТАЈ О ИСПИТИВАЊУ

ПИСАЊЕ ИЗВЕШТАЈА

Извештај о испитивању садржи:

1. Податке о експерименталним животињама:

– врсту/сој;

– број, старост и пол животиња;

– порекло животиња, услове смештаја, исхране итд.;

– индивидуалне телесне масе животиња на почетку испитивања, касније у недељним интервалима и на крају испитивања.

2. Податке о условима испитивања:

– образложење за избор помоћног средства, ако се не ради о води;

– разлоге за избор дозе/концентрације испитиване супстанце;

– детаље о формулацији испитиване супстанце, исхрани, постигнутој концентрацији испитиване супстанце, стабилности и хомогености припремљене формулације;

– детаље о начину примене испитиване супстанце;

– уколико је примењиво, прерачунавања концентрације испитиване супстанце примењене храном или путем воде (ppm) на дозу (mg/kg ТМ/дан);

– детаље о квалитету хране и воде.

3. Резултате:

– телесну масу/промене у телесној маси;

– конзумирање хране и воде;

– податке о забележеним токсичним ефектима приказане по полу и примењеној дози испитиване супстанце;

– податке о природи, тежини и трајању клиничких промена (да ли су реверзибилне или нису);

– процену сензорне активности, јачина стиска и моторне активности;

– резултате хематолошких испитивања, са релевантним контролним вредностима;

– резултате клиничко-биохемијских испитивања са релевантним контролним вредностима;

– телесну масу пре лишавања живота на хуман начин и масу појединачних органа;

– налазе постморталног прегледа;

– детаљан опис свих хистопатолошких налаза;

– податке о апсорпцији;

– статистичку обраду резултата, тамо где је одговарајуће.

4. Тумачење резултата.

5. Закључке.

4. ЛИТЕРАТУРА

Ова метода испитивања оралне токсичности заснива се на Упутству за испитивање OECD TG 407.

B.8. АКУТНА (ИНХАЛАЦИОНА) ТОКСИЧНОСТ (28 ДАНА) – ПОНОВЉЕНЕ ДОЗЕ

1. МЕТОДА ИСПИТИВАЊА

1.1. УВОД

Корисно је имати претходне податке о својствима испитиване супстанце као што су: расподела величине честица, притисак паре, тачка топљења, тачка кључања, тачка паљења и експлозивност (ако се ради о експлозивној супстанци).

Видети Општи увод, Део А.

1.2. ДЕФИНИЦИЈЕ

Видети Општи увод, Део Б.

1.3. РЕФЕРЕНТНЕ СУПСТАНЦЕ

Нису прописане.

1.4. ПРИНЦИП МЕТОДЕ ИСПИТИВАЊА

Групе експерименталних животиња дневно се излажу растућим концентрацијама испитиване супстанце током временског периода од 28 дана. Свака група животиња излаже се једној концентрацији. Када је неопходно, користи се и вехикулум који омогућава постизање одговарајуће концентрације испитиване супстанце у атмосфери. За вехикулум се одређује и додатна контролна група. Животиње се посматрају сваки дан током времена излагања испитиваној супстанци како би се уочили знакови токсичности. Животиње које угину за време експеримента подвргавају се постморталном прегледу, а по завршетку експеримента и преживеле животиње се лишавају живота на хуман начин и постмортално прегледају.

1.5. КРИТЕРИЈУМИ КВАЛИТЕТА

Нису прописани.

1.6. ОПИС МЕТОДЕ ИСПИТИВАЊА

1.6.1. Припрема

Животиње се држе у експерименталним условима и хране по дефинисаном експерименталном режиму најмање пет дана пре почетка испитивања. Пре испитивања здраве младе јединке насумце се групишу у претходно дефинисан број експерименталних група. Када је неопходно, додаје се вехикулум који омогућава постизање одговарајуће концентрације испитиване супстанце у атмосфери. Одабрани вехикулум не сме бити токсичан, што може да се потврди наводима постојеће литературе.

1.6.2. Услови испитивања

1.6.2.1. Експериментalне животиње

Ако не постоје контраиндикације, препоручује се коришћење пацова и то сојева који се најчешће користе у лабораторијским испитивањима.

На почетку испитивања, распон телесних маса појединачних животиња не сме да пређе ± 20% од средње вредности.

1.6.2.2. Број и пол

Најмање 10 глодара (пет женки и пет мужјака) користи се за сваку испитивану концентрацију. Женке морају бити такве да нису раније рађале и да нису гравидне. Ако се у току испитивања планирају превремена лишавања живота на хуман начин, број животиња у испитивању повећава се за број који је планиран за лишавање живота у току испитивања. Пратећа група од десет животиња (по пет животиња сваког пола) може се излагати високим концентрацијама испитиване супстанце у периоду од 28 дана, како би се 14 дана након третмана забележиле реверзибилност, постојаност или временски одложена појава токсичних ефеката. Уколико се обавља ово посматрање, укључује се помоћна група од 10 контролних животиња (по пет сваког пола).

1.6.2.3. Концентрације

Користе се најмање три концентрације испитиване супстанце, заједно са одговарајућим контролама (ако се користи вехикулум, друга контрола садржи вехикулум у највећој датој концентрацији). Осим примене испитиване супстанце, са животињама у контролним групама поступа се на исти начин као са животињама из испитиваних група. Највећа концентрација испитиване супстанце треба да изазове токсичне ефекте, али без или са минималним бројем угинулих животиња. Најнижа концентрација не треба да изазове токсичне ефекте. Када је могуће предвидети изложеност испитиваној супстанци код људи, најнижа концентрација примењена на животиње треба да буде мало виша од ове вредности. Идеално, средња концентрација испитиване супстанце изазива минималне токсичне ефекте. Ако се користи неколико средњих концентрација, тада су њихове вредности правилно размакнуте како би се постигла градација токсичних ефеката. У групама код којих су примењене ниске или средње концентрације испитиване супстанце, као и у контролним групама, учесталост смртних случајева код животиња треба да буде ниска како би интерпретација резултата имала смисла.

1.6.2.4. Дужина излагања

Трајање излагања током једног дана је шест сати. Други временски интервали могу се дефинисати по потреби.

1.6.2.5. Опрема

Животиње се подвргавају испитивању помоћу опреме којом се може одржавати константни проток ваздуха са најмање 12 потпуних измена у једном сату, како би се обезбедила одговарајућа концентрација кисеоника и равномерно распоређена атмосфера. Када се користи комора, њен дизајн мора да буде довољно пространа да минимизира скученост животиња и омогући максималну изложеност испитиваној супстанци удисањем. Као опште правило које обезбеђује стабилност атмосфере у комори користи се мера према којој „запремина" животиња не сме да буде већа од 5% укупне запремине коморе. Користе се различити типови комора који омогућавају изложеност читавог тела, само главе или само оро-назалних отвора животиње, а ове посљедње две коморе минимизирају изложеност испитиваној супстанци неким другим путем уноса.

1.6.2.6. Време посматрања

Експерименталне животиње посматрају се сваки дан како би се уочили знакови токсичности и то током трајања читавог експеримента као и за време опоравка. Важно је забележити време појаве или нестанка првих знакова тровања, као и време угинућа.

1.6.3. Поступак

Животиње се свакодневно излажу испитиваној супстанци, или пет до седам дана у недељи, у временском периоду од 28 дана. Животиње из пратећих група које су предвиђене за накнадна праћења задржавају се додатних 14 дана без третмана како би се забележила постојаност токсичних ефеката или опоравак.

Температура на којој се обавља испитивање одржава се на 22° C ± 3° C. Релативна влажност је између 30% и 70%, али у неким случајевима (нпр. код испитивања аеросола) ово није изводљиво. Одржавањем негативног притиска унутар коморе (± 5 mm воде) спречава се излазак испитиване супстанце у околину. За време излагања испитиваној супстанци животињама се не даје храна и вода.

У току испитивања користи се одговарајући динамични систем са могућношћу контроле концентрације испитиване супстанце. За успостављање одговарајуће концентрације испитиване супстанце, препоручује се обављање пробног испитивања. Комора је дизајнирана на такав начин да омогућава хомогену дистрибуцију ваздуха за време трајања експеримента. Систем мора да омогући стабилне услове и њихово успостављање у што краћем временском периоду.

Спроводе се мерења и прате следећи параметри:

а) брзина протока ваздуха (континуирано);

б) концентрације испитиване супстанце у зони удисања. Током дневних излагања, концентрација испитиване супстанце не сме да варира више од ± 15% од средње вредности. Код аеросола се тешко постиже оваква контрола дозирања, па се у том случају толеришу веће разлике у вредностима. За време трајања комплетног испитивања, дневне концентрације су што је могуће стабилније. За аеросоле се обавља и анализа величине честица (најмање једанпут недељно у свакој групи животиња);

в) температура и влажност (континуирано, ако је могуће).

Опажања се бележе систематично за време и након излагања. Свака животиња има посебан картон. Животиње се прате сваки дан, а знакови тровања бележе се редовно, укључујући време појаве, озбиљност и трајање. Бележе се промене на кожи и крзну, очима, слузници, респираторном, кардиоваскуларном, аутономном и централном нервном систему, као и

соматомоторна активност и начин понашања. Једном недељно одређује се телесна маса животиња и прати потрошња хране. Животиње се редовно прате како би се избегао губитак због канибализма или аутолизе ткива. На крају испитивања обавља се постмортални преглед свих преживелих животиња из основних (не пратећих) испитиваних група. Животиње које су изразито слабе или на самрти издвајају се из групе и лишавају живота на хуман начин, а потом се постмортално прегледају.

Следећа испитивања спроводе се на крају експеримента на свим животињама, укључујући и оне из контролне групе:

1) хематолошка испитивања, укључујући хематокрит, концентрацију хемоглобина, број еритроцита, број укупних и појединих лоза леукоцита, као и коагулабилност крви;

2) клиничко-биохемијска испитивања крви укључујући најмање један параметар који указује на функцију јетре и бубрега: аланин аминотрансфераза (позната и под називом: глутамат пируват трансаминаза), аспартат аминотрансфераза (позната и под називом: глутамат оксалоацетат трансаминаза), азот урее, албумин, креатинин, укупни билирубин и протеини у серуму.

Друга испитивања која могу бити потребна за адекватну евалуацију токсичности укључују одређивање калцијума, фосфора, хлорида, натријума, калијума, глукозе (у условима гладовања), липида, хормона, ацидо-базну равнотежу метхемоглобин и активност холинестеразе.

Додатне биохемијске анализе обављају се по потреби, како би се детаљније проучили токсични ефекти.

1.6.3.1. Постмортални преглед

Све експерименталне животиње детаљно се постмортално прегледају. Одмах након секције мере се, још влажни, следећи органи: јетра, бубрези, надбубрежне жлезде, плућа и тестиси. Органи и ткива (респираторни тракт, јетра, бубрези, слезина, тестиси, надбубрежне жлезде и срце, као и други органи на којима се примете промене у величини) чувају се у одговарајућем медијуму за даља хистопатолошка испитивања. Плућа се ваде нетакнута, мере и стављају у одговарајући фиксатор како би сачувала све структуре.

1.6.3.2. Хистопатолошка испитивања

У контролним групама и групама изложеним високим концентрацијама испитиване супстанце обављају се хистолошка испитивања изолованих органа и ткива. Органи и ткива који покажу оштећења која се могу приписати високим концентрацијама испитиване супстанце детаљно се испитују и код животиња које су биле изложене нижим концентрацијама. Животиње из пратећих група такође је потребно хистолошки обрадити са посебном пажњом на органима и ткивима која су показала промене и код животиња из других испитиваних група.

2. ПОДАЦИ

Подаци се приказују табеларно где се за сваку испитивану групу животиња наводи број животиња на почетку експеримента, као и број животиња код којих су пронађене промене.

Сви добијени резултати анализирају се помоћу одговарајуће статистичке методе. Користи се било која прихваћена статистичка метода.

3. ИЗВЕШТАЈ О РЕЗУЛТАТИМА

3.1. ПИСАЊЕ ИЗВЕШТАЈА

Извештај о испитивању садржи:

1. Податке о експерименталним животињама:

– врсту, сој, порекло, услове чувања, исхране, итд.

2. Податке о условима испитивања:

– опис коморе или апаратуре укључујући дизајн, тип, димензије, извор ваздуха, систем за распршивање аеросола, методе за кондиционирање ваздуха и начин чувања животиња у комори. Описује се и апаратуру за мерење температуре, влажности, концентрације аеросола и одређивање расподеле величине честица.

3. Податке о излагању испитиваној супстанци:

– ови подаци приказују се табеларно у виду средњих вредности са одступањима (стандардна девијација), а ако је могуће садрже и податке о:

а) брзини протока ваздуха кроз отворе у апаратури;

б) температури и влажности ваздуха;

в) номиналној концентрацији (укупном садржају испитиване супстанце која се уводи кроз отворе у апаратури, подељеном са запремином ваздуха);

г) природи вехикулума, ако је коришћен;

д) тачној концентрацији супстанце у зони удисања;

ђ) средњем масеном аеродинамичком дијаметру (ММАД) и геометријској стандардној девијацији (ГСД).

4. Податке о налазима о токсичним ефектима представљеним у односу на пол животиња и концентрацију испитиване супстанце.

5. Време угинућа у току експеримента, тј. да ли су животиње преживеле експеримент.

6. Опис токсичних и осталих ефеката; концентрацију без ефекта.

7. Време појаве абнормалности и њихов каснији ток.

8. Податке о исхрани и телесној маси.

9. Податке о хематолошким испитивањима и налазима.

10. Резултате клиничко-биохемијских испитивања.

11. Налазе постморталног прегледа.

12. Детаљан опис свих хистопатолошких налаза.

13. Статистичку обраду резултата где је могуће.

14. Расправу о резултатима.

15. Тумачење резултата.

3.2. ПРОЦЕНА И ТУМАЧЕЊЕ

Видети Општи увод, Део Г.

4. ЛИТЕРАТУРА

Видети Општи увод, Део Д.

B.9. АКУТНА (ДЕРМАЛНА) ТОКСИЧНОСТ(28 ДАНА) – ПОНОВЉЕНЕ ДОЗЕ

1. МЕТОДА ИСПИТИВАЊА

1.1. УВОД

Видети Општи увод, Део А.

1.2. ДЕФИНИЦИЈА

Видети Општи увод, Део Б.

1.3. РЕФЕРЕНТНЕ СУПСТАНЦЕ

Нису прописане.

1.4. ПРИНЦИП МЕТОДЕ ИСПИТИВАЊА

Испитивана супстанца примењује се свакодневно на кожу животиња подељених у групе у растућим дозама. На једну групу животиња примењује се једна доза током периода од 28 дана. Током примене испитиване супстанце животиње се свакодневно посматрају како би се бележили знакови токсичности. Животиње које угину током испитивања постмортално прегледају се, а на крају експеримента и преживеле животиње се лишавају живота на хуман начин и постмортално прегледају.

1.5. КРИТЕРИЈУМИ КВАЛИТЕТА

Нису прописани.

1.6. ОПИС МЕТОДЕ ИСПИТИВАЊА

1.6.1. Припрема

Животиње се држе у експерименталним условима и хране по дефинисаном експерименталном режиму најмање пет дана пре почетка испитивања. Пре испитивања, здраве младе животиње насумце се деле у испитиване и контролне групе. Непосредно пре почетка испитивања, животињама се уклања крзно са дорзалног дела тела. Крзно се може уклонити и бријањем, али је у том случају бријање потребно урадити 24 сата пре испитивања. Шишање и бријање се понављају једном недељно. Код уклањања крзна, пази се да не дође до оштећења коже. За примену испитиване супстанце чисти се најмање 10% укупне површине коже животиње. Код процене површине и димензија коже која се чисти узима се у обзир и телесна маса животиње. Ако се испитује чврста супстанца, која се по потреби може уситнити до праха, добијени прашак потребно је добро овлажити водом или неким другим вехикулумом како би се омогућио добар контакт са кожом. Ако се користи неки вехикулум, узима се у обзир и његов утицај на продирање испитиване супстанце кроз кожу. Испитиване супстанце које се већ налазе у течном облику, најчешће се користе неразблажене. Испитивана супстанца се примењује на кожу између пет до седам дана недељно.

1.6.2. Услови испитивања

1.6.2.1. Експерименталне животиње

За овакав тип испитивања најчешће се користе одрасли пацови, кунићи или заморци. Ако се користе друге врсте лабораторијских животиња, даје се образложење за ово коришћење.

На почетку експеримента распон телесних маса животиња не сме да прелази ± 20% од одговарајуће средње вредности.

1.6.2.2. Број и пол

Најмање 10 животиња (5 мужјака и 5 женки) са здравом кожом користе се за сваку испитивану дозу. Испитивање се врши на женкама које нису раније рађале и које нису гравидне. Ако се у току експеримента планирају превремена лишавања живота на хуман начин, број животиња у експерименту повећава се за број који се планира лишити живота у току испитивања. Пратећа група од 10 животиња (по пет сваког пола) може да се изложи високим концентрацијама испитиване супстанце у периоду од 28 дана, како би се 14 дана након третмана забележиле реверзибилност, постојаност или одложена појава токсичних ефеката. Уколико се обавља ово посматрање, укључује се помоћна група од 10 контролних животиња (по пет сваког пола).

1.6.2.3. Дозни нивои

Користе се најмање три дозе испитиване супстанце, заједно са одговарајућим контролама (ако се користи вехикулум, друга контрола се излаже вехикулуму). Време излагања је најмање шест сати дневно. Испитивана супстанца наноси се на кожу у приближно исто време сваког дана, а нанета доза се прилагођава (једанпут или два пута недељно) променама телесне масе животиње. Осим примене испитиване супстанце, са животињама у контролним групама поступа се идентично као са животињама из испитиваних група. Ако се користи вехикулум, контролна група животиња дозира се вехикулумом на исти начин као и испитивана група којој је примењена највећа доза. Највећа доза испитиване супстанце треба да изазове токсичне ефекте код животиња, али без или са минималним бројем угинулих животиња. Најнижа концентрација не треба да изазове токсичне ефекте.

Када је могуће предвидети изложеност испитиваној супстанци код људи, најнижа концентрација примењена на животиње треба да буде мало виша од ове вредности. Идеално, средња концентрација испитиване супстанце изазива минималне токсичне ефекте. Ако се користи неколико средњих концентрација, њихове вредности су правилно распоређене како би се постигла градација токсичних ефеката. У групама код којих су примењене ниске или средње концентрације испитиване супстанце, као и у контролним групама, учесталост смртних случајева код животиња треба да буде ниска како би тумачење резултата имало смисла.

Ако примена испитиване супстанце изазива тешку иритацију коже, дозе се смањују, што може утицати на смањење или потпуни нестанак других токсичних ефеката код високих доза. Ако дође до изразитих оштећења коже, препоручује се окончавање испитивања и почетак новог испитивања са нижим концентрацијама испитиване супстанце.

1.6.2.4. Испитивање граничне дозе

Ако претходно испитивање са дозом од 1.000 mg/kg или већом дозом у случајевима када се предвиђа изложеност људи већој дози не резултира токсичним ефектима, наставак испитивања сматра се непотребним.

1.6.2.5. Време посматрања

Експерименталне животиње посматрају се сваког дана како би се уочили знакови токсичности. Бележи се време појаве или нестанка првих знакова токсичности, као и време угинућа.

1.6.3. Поступак

Животиње се држе у засебним кавезима. У идеалним условима, животиње се третирају седам дана у недељи, током периода од 28 дана. Животиње из пратећих група које су предвиђене за накнадна праћења задржавају се додатних 14 дана без третмана како би се забележила постојаност токсичних ефеката или опоравак. Време излагања је најмање шест сати дневно.

Испитивана супстанца примењује се равномерно преко читаве површине која износи отприлике 10% од укупне површине коже. У случају веома токсичних супстанци, изложена површина може бити и мања, али је потребно примењени слој равномерно распоредити у што је могуће тањем слоју.

Током испитивања испитивана супстанца се држи у контакту са кожом помоћу порозне газе и фластера који не изазива иритацију коже. Место примене додатно се може прекрити како би се онемогућила ингестија испитиване супстанце. Ако је неопходно, животињи се стављају и додатни штитници којима се спречава директан контакт са третираном кожом, али се не препоручује комплетна имобилизација животиње. Као алтернатива користи се заштитни оковратник.

Након прописаног времена излагања, вишак испитиване супстанце уклања се испирањем водом или помоћу неког другог средства за чишћење коже.

Посматрања се свакодневно систематично бележе. Бележе се знакови токсичности, време њихове појаве, степен и трајање; промене на кожи и крзну, очима, слузокожи, респираторном, кардиоваскуларном, аутономном и централном нервном систему, као и соматомоторна активност и начин понашања. Једном недељно одређује се телесна маса животиња и бележе опажања везана за потрошњу хране. Редовно се прате животиње како би се избегао њихов губитак због канибализма или аутолизе ткива. На крају експеримента, постмортално прегледају се све преживеле животиње из основних (не пратећих) испитиваних гупа. Животиње које су изразито слабе или на самрти издвајају се из групе и лишавају живота на хуман начин, а потом се постмортално прегледају.

Спроводе се следећа испитивања на крају експеримента на свим животињама укључујући оне из контролне групе:

1. хематолошка испитивања, укључујући хематокрит, концентрацију хемоглобина, број еритроцита, број укупних и појединих лоза леукоцита, као и брзину згрушавања крви;

2. клиничко-биохемијска испитивања крви, укључујући најмање један параметар који указује на функцију јетре и бубрега: аланин аминотрансфераза (позната и под називом: глутамат пируват трансаминаза), аспартат аминотрансфераза (позната и под називом: глутамат оксалоацетат трансаминаза), азот урее, албумин, креатинин, укупни билирубин и протеини у серуму;

3. друга испитивања која могу бити потребна за адекватну евалуацију токсичности укључујући одређивање калцијума, фосфора, хлорида, натријума, калијума, глукозе (у условима гладовања), липида, хормона, ацидо-базну равнотежу, метхемоглобин и активност холинестеразе;

4. додатне биохемијске анализе обављају се по потреби, како би се детаљније проучили токсични ефекти.

1.6.4. Постморталн и преглед

Све експерименталне животиње детаљно се постмортално прегледају. Следећи органи мере се одмах након секције, још влажни: јетра, бубрези, надбубрежне жлезде, плућа и тестиси. Органи и ткива (респираторни тракт, јетра, бубрези, слезина, тестиси, надбубрежне жлезде и срце, као и други органи на којима се примете промене у величини) чувају се у одговарајућем медијуму за даља хистопатолошка испитивања. Плућа се ваде нетакнута, мере и стављају у одговарајући фиксатор како би се сачувале све структуре.

1.6.5. Хистопатолошка испитивања

У контролним групама и групама изложеним високим концентрацијама испитиване супстанце праве се хистолошка испитивања изолованих органа и ткива. Органи и ткива који покажу оштећења која се могу приписати високим концентрацијама испитиване супстанце детаљно се испитују и код животиња које су биле изложене нижим концентрацијама. Животиње из пратећих група такође је потребно хистолошки обрадити са посебним пажњом на органе и ткива која су показала промене и код животиња из других испитиваних група.

2. ПОДАЦИ

Подаци се приказују табеларно где се за сваку испитивану групу животиња наводи број животиња на почетку експеримента, као и број животиња код којих су пронађене промене.

Сви добијени резултати анализирају се одговарајућом статистичком методом. Користи се било која прихваћена статистичка метода.

3. ИЗВЕШТАЈ О ИСПИТИВАЊУ

3.1. ПИСАЊЕ ИЗВЕШТАЈА

Извештај о испитивању садржи:

1. Податке о експерименталним животињама:

– врсту, сој, порекло, услови смештаја, исхрана итд.

2. Податке о условима испитивања (укључујући начин примене, оклузивни или не-оклузивни).

3. Концентрације испитиване супстанце у дозама (концентрација вехикулума, ако је коришћен).

4. Податке о дози без штетног ефекта.

5. Податке о токсичним ефектима, сортиране према полу животиња и примењеној дози испитиване супстанце.

6. Време смрти у току експеримента, тј. да ли су животиње преживеле цели експеримент.

7. Опис токсичних или других ефеката.

8. Време опажања било каквих абнормалности, и њихов каснији ток

9. Податке о исхрани и телесној маси.

10. Податке о хематолошким испитивањима и налазима.

11. Резултате клиничко-биохемијских испитивања.

12. Налазе постморталног прегледа.

13. Детаљан опис свих хистопатолошких налаза.

14. Статистичку обраду резултата када је могуће.

15. Расправу о резултатима.

16. Тумачење резултата.

3.2. ПРОЦЕНА И ТУМАЧЕЊЕ

Видети Општи увод, Део Г.

4. ЛИТЕРАТУРА

Видети Општи увод, Део Д.

B.10. МУТАГЕНОСТ – *IN VITRO* ИСПИТИВАЊЕ ХРОМОЗОМСКИХ АБЕРАЦИЈА КОД СИСАРА

1. МЕТОДА ИСПИТИВАЊА

Ова метода испитивања заснива се на Упутству за испитивање OECD 473, *In vitro* испитивање хромозомских аберација (1997).

1.1. УВОД

Сврха *in vitro* испитивања хромозомских аберација је утврђивање агенаса који узрокују структурну хромозомску аберацију у култури ћелија сисара[1, 2, 3]. Постоје две врсте структурних аберација: хромозомска и хроматидна. Са већином хемијских мутагена изазване аберације су на хроматидама, али може доћи и до аберација на хромозомима. Повећање полипоидности може да укаже на то да хемикалија има потенцијал за изазивање нумеричких аберација. Ова метода није намењена за мерење нумеричких аберација и не користи се рутински у те сврхе. Хромозомске мутације и с њима повезани ефекти узрок су многих генетских обољења код људи. Постоје докази да хромозомске мутације и с њима повезани ефекти који изазивају промене у онкогенима и тумор-супресорским генима соматских ћелија имају улогу у изазивању канцера код људи и експерименталних животиња.

In vitro испитивање хромозомских аберација може да користи: културе утврђених ћелијских линија, ћелијских врста или у првом реду ћелијских култура. Ћелије се бирају на основу способности раста у култури, стабилности кариотипа, хромозомског броја, хромозомске х разноликости и спонтане фреквенције хромозомских аберација.

Испитивања која се обављају *in vitro* захтевају употребу егзогеног извора метаболичке активације. Овај систем метаболичке активације не може у целини да опонаша *in vivo* услове сисара. Води се рачуна да се избегавају услови који доводе до позитивних резултата, а који не одражавају суштинску мутагеност и који могу да настану услед промена у pH, осмолалности или услед високог нивоа цитотоксичности[4, 5].

Ово испитивање користи се за тражење могућих мутагена и карциногена за сисаре. Многе супстанце које су позитивне у овом испитивању, карциногене су за сисаре. Узајамна зависност између овог испитивања и карциногености није беспрекорна. Узајамна зависност зависи од хемијске класе. Све је више доказа да постоје карциногени који се не откривају овим испитивањем јер делују механизмима који су другачији од непосредног оштећења ДНК.

Видети Општи увод.

1.2. ДЕФИНИЦИЈЕ

Аберација типа хроматида јесте структурно оштећење хромозома изражено као прекидање појединих хроматида или прекидање и поновно спајање између хроматида.

Аберација типа хромозома јесте структурно оштећење хромозома изражено као прекидање појединих хроматида или прекидање и поновно спајање хроматида на идентичном месту.

Ендоредупликација јесте процес код којег након S фазе ДНК репликације језгро не улази у митозу, већ започиње друга S фаза. Резултат процеса су хромозоми са 4, 8, 16 и више хроматида.

„Gap” (прекид) јесте ахроматска лезија мања од ширине једне хроматиде и са минималном искривљеношћу хроматида.

Митотски индекс јесте однос броја ћелија у метафази и укупног броја ћелија које су посматране у популацији ћелија; односно митотски индекс јесте мера степена пролиферације те ћелијске популације.

Нумеричка аберација јесте промена у броју хромозома у односу на нормалан број карактеристичан за коришћене ћелије.

Полиплоидија јесте појава када ћелија садржи више од хаплоидног броја хромозома (n), осим када садржи диплоидни број хромозома (тј. 3n, 4n, итд.).

Структурна аберација јесте промена у структури хромозома која се може открити микроскопским прегледом у метафази ћелијске деобе, а која се запажа у виду делеција и фрагментација, транслокација или инверзија.

1.3. ПРИНЦИП МЕТОДЕ

Ћелијске културе излажу се испитиваној супстанци уз метаболичку активацију и без ње. Након излагања ћелијских култура испитиваној супстанци, у претходно одређеним интервалима, ћелијске културе се третирају супстанцама које прекидају метафазу (нпр. Colcemid® или колхицин); затим се узимају, боје и микроскопски се анализирају ћелије у метафази, односно испитују се на присутност хромозомских аберација.

1.4. ОПИС МЕТОДЕ

1.4.1. Препарати

1.4.1.1. Ћелије

Могу се користити различите ћелијске линије, сојеви или примарне ћелијске културе, укључујући хумане ћелије (нпр. фибробласти кинеског хрчка, хумани или други лимфоцити периферне крви сисара).

1.4.1.2. Медијум (хранљиве подлоге) и услови култивисања

За одржавање култура користе се одговарајуће хранљиве подлоге и услови инкубације (посуде, CO_2 концентрација, температура и влажност). Постојећим ћелијским линијама и сојевима рутински се проверава стабилност у модалном броју хромозома и одсуство контаминације микоплазмом при чему се ћелијске линије и сојеви не користе ако су контаминирани. Треба да буду познати уобичајено време ћелијског циклуса ћелије и услови култивисања који се користе.

1.4.1.3. Припрема култура

Утврђене ћелијске линије и сојеви: ћелије се умножавају од „stock" култура, засејавају се у подлози при густини која је таква да се у културама не достигне конфлуентност пре времена сакупљања и инкубирају се на температури од 37° C.

Лимфоцити: пуна крв третирана са антикоагулансом (нпр. хепарином) или издвојени лимфоцити добијени од здраве животиње додају се подлози који садржи митоген (нпр. фитохемаглутинин) и инкубирају се на температури од 37° C.

1.4.1.4. Метаболичка активација

Ћелије се излажу испитиваној супстанци у присуству и у одсуству одговарајућег система метаболичке активације. Најчешће коришћени систем је пост-митоходријална фракција са кофактором (C9) припремљена од јетре глодара третираних агенсима који индукују ензиме као што су: Aroclor 1254[6, 7, 8, 9] или смеша фенобарбитона и ß-нафтофлавона[10, 11, 12].

Пост-митохондријалне фракције обично се користе у концентрацијама у опсегу од 1% v/v до 10% v/v у коначној подлози. Услови метаболичке активације могу да зависе од класе хемикалије која се испитује. У неким случајевима прикладно је да се користи више од једне концентрације пост-митохондријалне фракције.

Поједина достигнућа, укључујући ћелијске линије добијене генетским инжењерингом код којих се јавља експресија специфичних активирајућих ензима, могу да омогуће потенцијал за ендогену активацију. Избор коришћених ћелијских линија мора да буде научно оправдан (нпр. релевантност изоензима цитохрома P450 за метаболизам испитиване супстанце).

1.4.1.5. Испитивана хемикалија

Испитиване супстанце у чврстом стању, пре третмана ћелија, растварају се или суспендују у одговарајућем растварачу или вехикулуму и, ако је потребно, разблажују. Испитиване супстанце у течном стању могу да се додају непосредно у испитивани систем, односно могу да се разблаже пре третмана. Користе се свежи препарати испитиване супстанце, осим ако подаци о стабилности показују да се препарати могу чувати.

1.4.2. Услови испитивања

1.4.2.1. Вехикулум

Вехикулум је такав да хемијски не реагује са испитиваном супстанцом и да буде компатибилан са преживљавањем ћелија и S9 активношћу. Ако се користи вехикулум који није општепознат, његова примена мора да буде образложена подацима који потврђују његову компатибилност. Препоручује се, кад год је могуће, да се у првом реду користе водени вехикулуми. Ако су испитиване супстанце нестабилне у води, органски растварачи која се користе не смеју да садрже воду. Вода може да се уклони додавањем молекуларног сита.

1.4.2.2. Концентрације излагања

Критеријуми који се разматрају код одређивања највиших концентрација су: цитотоксичност, растворљивост у испитиваном систему и промене pH или осмолалност.

Цитотоксичност се одређује са и без метаболичке активације у главном експерименту уз коришћење одговарајуће индикације за ћелијски интегритет и раст, као што је степен здруживања, број живих ћелија или митотски индекс. Корисно је да се у претходном експерименту одреди цитотоксичност и растворљивост.

Анализира се најмање три концентрације. Концентрације које изазивају цитотоксичност покривају опсег од максималне до мале токсичности или без токсичности; што обично значи да се концентрације међусобно разликују највише за фактор између √2 и √10. У време зрелости највиша концентрација мора да покаже знатно смањење степена здруживања, броја ћелија или митотског индекса (све веће од 50%). Митотски индекс је посредна мера цитотоксичних/цитостатских ефеката и зависи од времена након третмана. Митотски индекс прихватљив је за суспензије култура код којих би друге мере токсичности могле да буду компликоване и непрактичне. Податак о кинетици циклуса ћелије као што је просечно време генерисања (у даљем тексту: AGT) може да се користи као додатни податак. AGT је средња вредност која не открива увек постојање субпопулација, и чак и мали порасти просечног времена генерације могу да буду повезани са врло битним кашњењем у времену оптималне продукције аберација.

За супстанце које су релативно нецитотоксичне, највиша испитивана концентрација је 5 µL/mL, 5 mg/mL или 0,01 M, зависно од тога која концентрација је нижа.

За релативно нерастворне супстанце које нису токсичне при производу концентрација њених јона нижем од производа растворљивости, највиша доза која се користи је изнад границе растворљивости у коначној подлози на крају третмана. У неким случајевима (нпр. кад се токсичност супстанце појављује само при производу концентрација јона вишим од производа

растворљивости), препоручује се да се испитивање обави са више од једне дозе са талогом. Процена растворљивости на почетку и на крају третмана може да буде од користи, јер се растворљивост може мењати током излагања у систему испитивања услед присутности ћелија, S9, серума, итд. Талог може да се открије голим оком. Талог не сме да утиче на оцењивање.

1.4.2.3. Позитивне и негативне контроле

Истовремене позитивне и негативне (вехикулум) контроле, са и без метаболичке активације, укључене су у сваки експеримент. Ако се користи метаболичка активација, позитивне контролне хемикалије су оне које захтевају активацију, како би дале мутагени одговор.

Код позитивних контрола користи се познати кластоген и нивои изложености код којих се очекује добијање репродуктивног повећања у односу на контролу, што указује на осетљивост испитиваног система.

Концентрације позитивне контроле треба да покажу јасне ефекте, али да лицу које обавља тумачење резултата не буде одмах познат идентитет кодираних слајдова.

Примери супстанци за позитивну контролу:

Табела 1.

Услови метаболичке активације	Супстанца	CAS бр.	EINEC бр.
Одсуство егзогене метаболичке активације	Метил метансулфонат	66-27-3	200-625-0
	Етил метансулфонат	62-50-0	200-536-7
	Етил нитрозоуреа	759-73-9	212-072-2
	Митомицин *C*	50-07-7	200-008-6
	4–Нитрохинолин–N–оксид	56-57-5	200-281-1
Присуство егзогене метаболичке активације	Бензо[*a*]пирен	50-32-8	200-028-5
	Циклофосфамид Циклофосфамид монохидрат	50-18-0 6055-19-2	200-015-4

За позитивну контролу могу да се користе и друге супстанце. Када је могуће, разматра се употреба позитивне контроле која је сродне класе испитиваној хемикалији.

Негативне контроле које се састоје само од вехикулума у подлози за третирање и са којима се поступа на исти начин као и са третираним културама, укључене су за свако време сакупљања. Користе се и нетретиране контроле, осим ако постоје подаци контроле из ранијих студија који показују да одабрани растварач не изазива никакве штетне нити мутагене ефекте.

1.4.3. Поступак

1.4.3.1. Третман испитиваном супстанцом

Ћелије се током пролиферације третирају испитиваном супстанцом у присуству или одсуству система метаболичке активације. Обрада лимфоцита почиње око 48 сати након стимулације митозе.

1.4.3.2.

За сваку концентрацију обично се користе културе у дупликату, а строго се препоручују за негативне контролне културе односно контролне културе вехикулума. Када на основу постојећих података могу да се покажу минималне промене између култура у дупликату[13, 14] прихватљиво је коришћење једне културе за сваку концентрацију.

Гасовите или испарљиве супстанце се испитују одговарајућим методама, нпр. коришћењем херметички затворених посуда за култивисање[15, 16].

1.4.3.3. Време сакупљања културе

У првом експерименту ћелије се излажу испитиваној супстанци 3 до 6 сати са и без метаболичке активације, а узорци се узимају после приближно 1,5 дужине нормалног ћелијског циклуса након почетка третмана[12]. Ако овај протокол да негативне резултате и са и без активације, обавља се додатни експеримент без активације, са непрекидним третманом до узорковања после приближно 1,5 дужине нормалног ћелијског циклуса. Одређене хемикалије могу се лакше открити код времена третмана/узорковања које је дуже од 1,5 дужине циклуса. Негативни резултати са метаболичком активацијом морају да се потврде у зависности од случаја. У случајевима када се потврда негативних резултата не сматра потребном, даје се образложење.

1.4.3.4. Припрема хромозома

Ћелијске културе третирају се Colcemid®-ом или колхицином обично један до три сата пре сакупљања. Свака ћелијска

култура сакупља се и обрађује посебно за припрему хромозома. Припрема хромозома обухвата: третирање ћелија хипотоничним раствором, фиксацију и бојење.

1.4.3.5. Анализа

Сви слајдови, укључујући оне позитивних и негативних контрола, независно се кодирају пре микроскопске анализе. Поступци фиксације често доводе до прекида пропорције метафазних ћелија са губитком хромозома, па процењиване ћелије садрже број центромера који је једнак модалном броју ± 2 за све врсте ћелија. Најмање 200 добро распоређених метафаза, подједнако подељених између дупликата, мора да се уочи по концентрацији и контроли. Тај број може да буде и мањи ако се уочи велики број аберација.

Иако је сврха испитивања откривање хромозомских аберација, важно је забележити и полиплоидију и ендоредупликацију, уколико се уоче.

2. ПОДАЦИ

2.1. ОБРАДА РЕЗУЛТАТА

Експериментална јединица је ћелија. Због овога се процењује проценат ћелија са структурним хромозомским аберацијама. Структурно различите врсте хромозомских аберација уписују се са својим бројевима и учесталостима за експерименталне и контролне културе. Оштећења се уписују одвојено и наводе у извештају, али генерално нису укључена у укупну учесталост аберација.

Истовремене мере цитотоксичности за све третиране и негативне контролне културе у главним испитивањима аберација, такође се бележе.

Наводе се подаци о свакој појединачној култури. Сви подаци се наводе сажето у табели.

Не постоје захтеви за потврду јасног позитивног одговора. Двосмислени резултати се разјашњавају даљим испитивањем, ако је могуће модификацијама експерименталних услова. Потреба за потврђивањем негативних резултата размотрена је одељку 1.4.3.3. ове методе. За извођење даљих разматра се модификација параметара испитивања за проширење опсега процењених услова. Параметри испитивања се могу модификовати обухватају опсег концентрације и услове метаболичке активације.

2.2. ПРОЦЕНА И ТУМАЧЕЊЕ РЕЗУЛТАТА

Постоји неколико критеријума за одређивање позитивног резултата, као што је повећање зависно од концентрације или репродуцибилно повећање броја ћелија са хромозомским аберацијама. Прво се разматра биолошка релевантност резултата. Статистичке методе могу да се користе као помоћ у процени резултата испитивања[3, 13]. Статистички значај не може да буде једини фактор који одређује позитивни одговор.

Повећање броја полиплоидних ћелија може да укаже на то да испитивана супстанца има потенцијал да инхибира процесе митозе и изазове нумеричке хромозомске аберације. Повећање броја ћелија са ендоредупликованим хромозомима може да укаже на то да испитивана супстанца има потенцијал да инхибира прогресију ћелијског циклуса[17, 18].

Испитивана супстанца за коју резултати испитивања не задовољавају горе наведене критеријуме сматра се немутагеном у овом систему.

Иако већина експеримената даје јасне позитивне или негативне резултате, у ретким случајевима добијени подаци не омогућавају доношење коначне процене активности испитиване супстанце. Резултати могу да остану двосмислени или нејасни без обзира на то колико пута је експеримент поновљен.

Позитивни резултати из *in vitro* испитивања аберације хромозома указују да испитивана супстанца изазива структурне аберације хромозома у култури соматских ћелија сисара. Негативни резултати указују да, под испитиваним условима, испитивана супстанца не изазива аберацију хромозома у култури соматских ћелија сисара.

3. ИЗВЕШТАЈ

Извештај о испитивању садржи податке о:

1) Вехикулуму:

– образложење за избор вехикулума;

– растворљивост и стабилност испитиване супстанце у вехикулуму, ако су познати.

2) Ћелијама:

– врста и порекло ћелија;

– кариотипне карактеристике и подесност коришћене врсте ћелија;

– одсуство микоплазме, ако је примењиво;

– податак о дужини ћелијског циклуса;

– пол даваоца крви, пуна крв или коришћени одвојени лимфоцити, митоген;

– број пролаза, ако је применљиво;

– методе за одржавање културе ћелије, ако је применљиво;

– модални број хромозома.

3) Условима испитивања:

– идентитет супстанце која је коришћена за заустављање метафазе, њена концентрација и трајање изложености ћелије;

– аргументација за избор концентрација и број култура, укључујући нпр. податке о цитотоксичности, ограничењу растворљивости, ако су доступни;

– састав подлоге, концентрација CO_2, ако је применљиво;

– концентрација испитиване супстанце;

– запремина вехикулума и додате испитиване супстанце;

– температура инкубације;

– време инкубације;

– трајање третмана;

– густина ћелија код засејавања, ако је применљиво;

– врста и састав система метаболичке активације, укључујући критеријуме прихватљивости;

– позитивне и негативне контроле;

– методе припреме слајдова;

– критеријуми за процену аберације;

– број анализираних метафаза;

– методе за мерење токсичности;

– критеријуми за сматрање студија позитивним, негативним или двосмисленим.

4) Резултатима:

– знакови токсичности, тј. степен конфлуенције, подаци о ћелијском циклусу, број избројаних ћелија, митотски индекс;

– знакови таложења;

– подаци о pH и осмолалности подлоге за третирање, ако је одређено;

– дефиниција за аберације, укључујући оштећења;

– број ћелија са хромозомским аберацијама и врста аберација хромозома, за сваку третирану и контролну културу посебно;

– промене у плоидији, ако се виде;

– однос доза – одговор, када је могуће;

– евентуалне статистичке анализе;

– подаци о истовременој негативној (вехикулум) и позитивној контроли;

– подаци из литературе о негативној (вехикулум) и позитивној контроли са опсезима, средњим вредностима и стандардним девијацијама.

5) Образложењу резултата.

6) Закључцима.

4. ЛИТЕРАТУРА

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

chromatic exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals. Environs. Molec. Mutagen 10 (suppl. 10), p. 1-175.

4. Scott, D., Galloway, S.M., Marshall, R.R., Ishidate, 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., Tates, A.D., van Buul, P.P.W., Meijers, M. and de Vogel, 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, G.G., 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 *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. МУТАГЕНОСТ – *IN VIVO* ИСПИТИВАЊЕ ХРОМОЗОМСКИХ АБЕРАЦИЈА НА КОСТНОЈ СРЖИ СИСАРА

1. МЕТОДА ИСПИТИВАЊА

Метода испитивања заснива се на Упутству за испитивање OECD 475, Испитивање хромозомских аберација у костној сржи сисара (1997).

1.1. УВОД

Испитивање хромозомских аберација *in vivo* код сисара користи се за откривање структурних хромозомских аберација које је испитивана супстанца изазвала у ћелијама костне сржи животиња, обично глодара[1, 2, 3, 4]. Структурне хромозомске аберације могу бити двојаке: хромозомске и хроматидне. Повећање полиплоидности може да укаже на то да хемикалија има потенцијал да изазове нумеричке аберације. Већина хемијских мутагена изазива аберације хроматидног типа, али долази и до аберација хромозомског типа. Хромозомске мутације и са њима повезане појаве узрок су многих генетских болести код људи и постоје значајни докази да су хромозомске мутације и са њима повезане појаве, које изазивају промене онкогена и тумор-супресорских гена, повезане са раком код људи и у експерименталним системима.

У овој методи испитивања обично се користе глодари. Костна сржи представља циљно ткиво овог испитивања, с обзиром да је реч о високо прокрвљеном ткиву које садржи популацију ћелија које брзо пролазе кроз циклусе, а које је могуће лако изоловати и обрадити. Друге животињске врсте и циљна ткива нису предмет ове методе испитивања.

Наведено испитивање хромозомских аберација посебно је релевантно за процену опасности од мутагеног дејства јер

омогућава да се узме у обзир метаболизам *in vivo*, фармакокинетичке и процесе репарације ДНК, иако се исти могу разликовати код различитих врста и ткива. *In vivo* испитивање корисно је и за даље истраживање мутагених ефеката откривених приликом *in vitro* испитивања.

Овај облик испитивања не одговара уколико се појаве докази да испитивана супстанца или реактивни метаболит неће доспети до циљног ткива.

Видети Општи увод.

1.2. ДЕФИНИЦИЈЕ

Аберација типа хроматида јесте структурно оштећење хромозома изражено као прекидање појединих хроматида или прекидање и поновно спајање између хроматида.

Аберација типа хромозома јесте структурно оштећење хромозома изражено као прекидање појединих хроматида или прекидање и поновно спајање хроматида на идентичном месту.

Ендоредупликација јесте процес код кога након S фазе репликације ДНК језгро не улази у митозу него започиње друга S фаза. Резултат су хромозоми са 4, 8, 16 и више хроматида.

„Gap" (прекид) јесте ахроматска лезија мања од ширине једне хроматиде и са минималном искривљености хроматида.

Нумеричка аберација јесте промена у броју хромозома у односу на нормалан број карактеристичан за ћелије које се користе.

Полиплоидија јесте појава када ћелија садржи више од хаплоидног броја хромозома (n), осим када садржи диплоидни број (тј. 3n, 4n, итд).

Структурна аберација јесте промена у структури хромозома која се може открити микроскопским прегледом у метафази ћелијске деобе, а која се запажа у виду делеција и фрагментација, транслокација или инверзија.

1.3. ПРИНЦИП МЕТОДЕ

Животиње се одговарајућим путем излажу испитиваној супстанци и лишавају живота на хуман начин у одређено време након третирања. Пре лишавања живота на хуман начин, животиње се третирају агенсом за заустављање метафазе (нпр. колхицином или Colcemid®-ом). Након тога, припреме се препарати хромозома ћелија костне сржи и анализирају се ћелије у метафази са циљем утврђивања хромозомских аберација.

1.4. ОПИС МЕТОДЕ

1.4.1. Припреме

1.4.1.1. Избор животињске врсте

Обично се користе пацови, мишеви и кинески хрчци. Могу се користити и друге одговарајуће врсте сисара. Користе се младе, здраве, одрасле животиње сојева који се уобичајено употребљавају. Приликом започињања истраживања одступање у телесној маси животиња треба да буде минимално и да не прелази ± 20% просечне телесне масе за сваки пол.

1.4.1.2. Услови смештаја и исхране

Примењују се општи услови који су наведени у Општем уводу, иако се настоји да се влажност одржи на нивоу од 50% до 60%.

1.4.1.3. Припрема животиња

Здраве одрасле животиње насумично се групишу у контролну и третиране групе. Кавези су такви да могући ефекти на испитивање буду минимални. Животиње се појединачно означавају. Животиње се аклиматизују на лабораторијске услове најмање пет дана пре почетка испитивања.

1.4.1.4. Припрема доза

Пре третирања животиња испитиваном супстанцом чврсте испитиване супстанце се растварају или суспендују у одговарајућим вехикулумима и, уколико је потребно, разблажују. Течне испитиване супстанце могу директно да се примене или да се разблаже пре примене. Свежи препарати испитиване супстанце се одмах употребљавају, осим уколико подаци о стабилности не показују да је чување прихватљиво.

1.4.2. Услови испитивања

1.4.2.1. Вехикулум

Вехикулум не сме да изазива токсичне ефекте при дозним нивоима који се примењују и не сме да постоји сумња да ће хемијски да реагује са испитиваном супстанцом. Уколико се примењују мање познати вехикулуми, њихово укључивање у испитивање се образлаже подацима који указују на њихову компатибилност. Кад год је могуће, препоручује се примена воденог раствора.

1.4.2.2. Контроле

Истовремене позитивне и негативне (вехикулум) контроле се укључују у свако испитивање и за сваки пол. Осим

примене испитиване супстанце, са животињама у контролним групама се поступа на исти начин као и са животињама у третираним групама.

Позитивне контроле производе структурне аберације *in vivo* при нивоима изложености за које се очекује да ће дати повећање у односу на позадину која може да се детектује. Позитивне контролне дозе бирају се тако да ефекти буду јасни, али да лицу које очитава резултате одмах не открију идентитет шифрираних микроскопских препарата (слајдова). Дозвољено је да се супстанца која је позитивна контрола примени путем који је различит од пута примене испитиване супстанце, и да се узоркује само једном. Може се узети у обзир примена позитивних контрола које припадају истој хемијској класи као и испитивана хемикалија. Примери супстанци које се користе као позитивне контроле:

Табела 1.

Супстанца	CAS бр.	EINECS бр.
етил метансулфонат	62-50-0	200-536-7
етил нитрозоуреа	759-73-9	212-072-2
митомицин *C*	50-07-7	200-008-6
циклофосфамид циклофосфамид монохидрат	50-18-0 6055-19-2	200-015-4
триетиленмеламин	51-18-3	200-083-5

Негативне контроле, третиране само вехикулумом, са којима се иначе поступа на исти начин као са групама обухваћеним третманом, су обухваћене сваким узорковањем, осим уколико су доступни подаци о варијабилности у оквиру врсте и у фреквенцији ћелија са хромозомским аберацијама. Уколико се на негативне контроле примењује једно узорковање, најпримеренije је време првог узорковања. Истовремено се користе и нетретиране контроле (контролни узроци), осим уколико постоје подаци о контролама из ранијих студија или објављени контролни подаци који доказују да одабран вехикулум не изазива штетне или мутагене ефекте.

1.5. ПОСТУПАК

1.5.1. Број и пол животиња

Свака третирана и контролна група обухвата најмање пет животиња истог пола на којима је могуће обавити анализу. Уколико постоје подаци истраживања обављеног на истој врсти и истим путем излагања који доказују да не постоје значајније разлике у токсичности међу половима, довољно је обавити испитивање код само једног пола. У случајевима у којима излагање људи хемикалијама може да буде специфично за одређени пол, као на пример код неких фармацеутских агенса, испитивање се обавља на животињама одговарајућег пола.

1.5.2. План третмана

Препоручује се примена испитиване супстанце у оквиру једног третмана. Испитиване супстанце је могуће давати у облику подељене дозе, тј. два третмана током истог дана у размаку од највише неколико сати, како би се олакшало давање велике запремине испитиване супстанце. Остали режими третирања научно се оправдавају.

Узорци се узимају у два наврата након третмана током једног дана. Код глодара прво време узорковања је 1,5 дужина редовног ћелијског циклуса (који износи 12 до 18 сати) након третмана. С обзиром да време које је потребно за унос и метаболизам испитиване супстанце, као и за њен ефекат на динамику ћелијског циклуса, може да утиче на оптимално време потребно за откривање хромозомске аберације, препоручује се и касније узимање узорка: 24 сата након првог узорковања. Уколико се примењују режими третирања испитиваном супстанцом дужи од једног дана, након последњег третмана обавља се једно узорковање од око 1,5 дужине нормалног ћелијског циклуса.

Пре лишавања живота на хуман начин животињама се интраперитонеално убризгава одговарајућа доза агенса за заустављање метафазе (нпр. Colcemid® или колхицин). Животињама се након тога узимају узорци у одговарајућим интервалима. За мишеве наведени интервал износи отприлике 3 до 5 сати, а за кинеске хрчке интервал је приближно 4 до 5 сати. Ћелије се изолују из костне сржи и анализирају ради откривања хромозомских аберација.

1.5.3. Дозни нивои

Уколико се испитивање обавља са циљем утврђивања опсега доза због тога што нема доступних података, наведено испитивање се обавља у истој лабораторији, уз коришћење исте врсте, соја, пола и режима третирања као и у главном испитивању[5]. Уколико постоји токсичност, за прво узорковање користе се три дозна нивоа. Наведене дозе обухватају опсег од максималне до ниске токсичности или ниво без токсичности. Приликом наредног узорковања потребно је користити само највишу дозу. Највиша доза се дефинише као доза услед које настају такви знакови токсичности да би виша доза проузроковала угињавање животиња. Супстанце специфичне биолошке активности у малим нетоксичним дозама (попут хормона и митогена) могу бити изузетак за примену критеријума за избор доза и тада се дозе процењују у зависности од случаја. Највиша доза се дефинише и као доза која доводи до неких индикација токсичности у костној сржи (нпр. смањење митотског индекса веће од 50%).

1.5.4. Испитивање граничне дозе

Уколико у испитивању са једном дозом од најмање 2.000 mg/kg ТМ у једнократном третману или у два третмана током истог дана не настану никакви приметни токсични ефекти и уколико се на основу података о структурно сродним супстанцама не очекује генотоксичност, није потребно применити комплетно испитивање применом три дозна нивоа. За испитивања у трајању до 14 дана гранична доза износи 2.000 mg/kg ТМ/дан, а за третмане који трају дуже од 14 дана 1.000 mg/kg ТМ/дан. Очекивана изложеност људи може да укаже на потребу за применом више дозе у испитивању граничне дозе.

1.5.5. Примена доза

Испитивана супстанца обично се примењује интубацијом и то коришћењем желудачне сонде или одговарајуће интубационе каниле или интраперитонеалном ињекцијом. Могу се применити и други путеви излагања уз навођење образложења за ту примену. Максимална запремина течности коју је могуће дати путем сонде или ињекцијом у једном наврату зависи од величине експерименталне животиње. Запремина не прелази 2 mL/100 g ТМ. Употребу већих запремина потребно је образложити. Изузев у случају иритативних и корозивних супстанци код којих ће се нормално испољити погоршани ефекти при вишим концентрацијама, одступања у запремини треба да буду минимална подешавањем концентрације, како би се обезбедила константна запремина при свим нивоима доза.

1.5.6. Хромозомски препарат

Одмах након што се животиња лиши живота на хуман начин, узима се костна срж која се излаже хипотоничном раствору и фиксира. Ћелије се нанесу на микроскопске плочице и обоје.

1.5.7. Анализа

Као мера цитотоксичности одређује се митотски индекс у најмање 1.000 ћелија по животињи за све третиране животиње (укључујући позитивне контроле) и нетретиране животиње негативне контролне групе.

Анализи се подвргава најмање 100 ћелија сваке животиње. Наведени број се може смањити уколико се уочи велики број аберација. Све препарате (слајдове), укључујући оне позитивне и негативне контроле, потребно је шифровати пре микроскопске анализе. С обзиром да поступци израде препарата често имају за последицу промену пропорције метафаза уз губитак хромозома, ћелије које се броје садрже број центромера једнак броју 2n ± 2.

2. ПОДАЦИ

2.1. ОБРАДА РЕЗУЛТАТА

Подаци који се односе на поједине животиње наводе се табеларно. Животиња представља експерименталну јединицу. За сваку животињу потребно је одредити број ћелија које се процењују, број аберација по ћелији и проценат ћелија са структурним хромозомским аберацијама. Наводе се различите врсте структурних хромозомских аберација заједно са својим бројевима и фреквенцијама, а у односу на третиране и контролне групе. Хромозомски прекиди наводе се одвојено, али се генерално не укључују у укупну учесталост аберација. Уколико не постоје докази о разликама међу половима, податке добијене испитивањем оба пола могуће је сјединити ради статистичке анализе.

2.2. ПРОЦЕНА И ТУМАЧЕЊЕ РЕЗУЛТАТА

Постоји неколико критеријума за утврђивање позитивног резултата, као што је дозно зависно повећање релативног броја ћелија са хромозомским аберацијама или јасно повећање броја ћелија са аберацијама у групи која је примила једну дозу, приликом јединог времена узорковања. Првенствено се узима у обзир биолошки значај резултата. Статистичке методе се могу применити као помоћно средство приликом вредновања резултата испитивања[6]. Статистички значај не треба да буде једини фактор за утврђивање позитивне реакције. Двосмислени резултати се појашњавају даљим испитивањем, најбоље модификовањем експерименталних услова.

Повећање полиплоидности може да укаже на то да испитивана супстанца има потенцијал да изазове нумеричке хромозомске аберације. Повећање ендоредупликације (ендомитозе) може да укаже на то да испитивана супстанца има потенцијал да инхибира прогресију ћелијског циклуса[7, 8].

Испитивана супстанца за коју добијени резултати не задовољавају горе наведене критеријуме, сматра се немутагеном у овом испитивању.

Иако већина експеримената даје јасно позитивне или негативне резултате, у ретким случајевима утврђени подаци не омогућавају доношење коначне одлуке о деловању испитиване супстанце. Резултати могу остати двосмислени или под знаком питања, без обзира на број обављених експеримената.

Позитивни резултати испитивања хромозомских аберација *in vivo* указују на то да супстанца узрокује хромозомске аберације у костној сржи испитиване животињске врсте. Негативни резултати указују на то да, под наведеним експерименталним условима, испитивана супстанца не изазива аберације у костној сржи испитиване врсте.

Потребно је размотрити вероватноћу да испитивана супстанца или њени метаболити доспеју у крвоток или, конкретно, до циљног ткива (нпр. системска токсичност).

3. ИЗВЕШТАЈ

Извештај о испитивању садржи податке о:

1) Вехикулуму:

– оправданост избора вехикулума;

– растворљивост и стабилност испитиване супстанце у вехикулуму, уколико су познати.

2) Експерименталним животињама:

– врста/сој;

– број, старост и пол животиња;

– извор/порекло, смештај, исхрана, итд.;

– појединачна телесна маса животиња на почетку испитивања, укључујући распон телесне масе, средњу вредност и стандардну девијацију за сваку групу.

3) Условима испитивања:

– позитивна и негативна (вехикулум) контрола;

– резултати испитивања за утврђивање распона доза, уколико је обављено;

– образложење за избор дозних нивоа;

– детаљи припреме испитиване супстанце;

– детаљи примене испитиване супстанце;

– образложење пута примене;

– методе за потврду чињенице да је испитивана супстанца доспела у системски крвоток или до циљног ткива, уколико је применљиво;

– начин прерачунавања концентрације испитиване супстанце у храни/води за пиће (ppm) у дозу (mg/kg ТМ/дан), уколико је применљиво;

– детаљи о квалитету хране и воде;

– детаљан опис распореда третмана и узорковања;

– методе за мерење токсичности;

– идентитет супстанце која зауставља метафазу, њена концентрација и трајање третмана;

– методе припремања микроскопских препарата;

– критеријуми за пребројавање аберација;

– број анализираних ћелија по животињи;

– критеријуми за проглашавање испитивања позитивним, негативним или двосмисленим.

4) Резултатима:

– знакови токсичности;

– митотски индекс;

– врста и број аберација, појединачно наведених за сваку животињу;

– укупан број аберација по групи, средња вредност и стандардна девијација;

– број ћелија са аберацијама по групи, средња вредност и стандардна девијација;

– промене у плоидији, уколико су уочене;

– однос доза – одговор, где је могуће;

– статистичке анализе, уколико постоје;

– подаци истовремене негативне контроле;

– негативни контролни подаци из литературе са опсезима, средњим вредностима и стандардним девијацијама;

– истовремени позитивни контролни подаци.

5) Образложењу резултата.

6) Закључцима.

4. ЛИТЕРАТУРА

1. Adler, I.D., (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. Lovell, 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. МУТАГЕНОСТ – МИКРОНУКЛЕУС ТЕСТ *IN VIVO* НА ЕРИТРОЦИТИМА СИСАРА

1. МЕТОДА ИСПИТИВАЊА

Метода испитивања заснива се на Упутству за испитивање OECD 474, Микронуклеус тест на еритроцитима сисара (1997).

1.1. УВОД

Микронуклеус тест *in vivo* код сисара користи се за откривање оштећења изазваних испитиваном супстанцом на хромозомима или митотском систему еритробласта, на основу анализе еритроцита из костне сржи и/или ћелија периферне крви животиња, обично глодара.

Сврха микронуклеус теста јесте идентификација супстанци које изазивају цитогенетска оштећења која за последицу имају формирање микронуклеуса који садржи заостале фрагменте хромозома или читаве хромозоме.

Када се еритробласт костне сржи развије у полихроматски еритроцит, главни нуклеус бива истиснут; сваки настали микронуклеус може да заостане у цитоплазми која иначе нема језгро. Видљивост микронуклеуса у овим ћелијама олакшана је с обзиром да им недостаје главно језгро. Повећање учесталости полихроматских еритроцита са микронуклеусима код третираних животиња показатељ је изазваних хромозомских оштећења.

За наведено испитивање обично се користи костна сржглодара, јер се производња полихроматских еритроцита одвија у том ткиву. Мера микронуклеусних незрелих (полихроматских) еритроцита у периферној крви једнако је прихватљива код било које врсте код које је доказана неспособност слезине да уклони микронуклеусне еритроците или која је показала одговарајућу осетљивост на откривање агенса који изазивају структурне или нумеричке хромозомске аберације. Микронуклеусе је могуће разликовати на основу већег броја критеријума. Наведени критеријуми обухватају идентификацију присуства или одсуства кинетохоре или центромере ДНК у микронуклеусима. Учесталост микронуклеусних незрелих (полихроматских) еритроцита представља циљни показатељ испитивања. У случајевима када се животиње непрекидно третирају током четири недеље или дуже, као крајња тачка испитивања може се користити број зрелих (нормохроматских) еритроцита у периферној крви који садрже микронуклеусе у датом броју зрелих еритроцита.

In vivo микронуклеус тест код сисара посебно је важан за процену мутагености јер узима у обзир факторе метаболизма *in vivo*, фармакокинетку и процесе репарације ДНК, иако исти могу да се разликују између различитих врста и ткива, као и између различитих генетских показатеља испитивања. *In vivo* испитивање корисно је и за даље истраживање мутагених ефеката откривених у *in vitro* систему.

Ово испитивање не одговара уколико се појаве докази да испитивана супстанца или реактивни метаболит неће стићи до циљног ткива.

Видети Општи увод.

1.2. ДЕФИНИЦИЈЕ

Центромера (Кинетохора) јесте подручје(а) хромозома са којима су током ћелијске деобе повезане нити деобног вретена, а чиме је омогућено уредно кретање кћерки хромозома према половима кћерки ћелија.

Микронуклеуси јесу засебни мали нуклеуси, одвојени од главног једра ћелије, настали током телофазе митозе (мејозе) заостајањем фрагмената хромозома или читавих хромозома.

Нормохроматски еритроцити јесу зрели еритроцити којима недостају рибозоми. Могу се разликовати од незрелих

полихроматских еритроцита на основу црта карактеристичних за присуство рибозома.

Полихроматски еритроцити јесу незрели еритроцити у прелазној фази развоја који још увек садрже рибозоме. Могу се разликовати од зрелих, нормохроматских еритроцита на основу црта карактеристичних за присуство рибозома.

1.3. ПРИНЦИП МЕТОДЕ

Животиње се одговарајућим путем излажу испитиваној супстанци. Уколико се користи костна срж, животиње се лишавају живота на хуман начин у одговарајуће време након третмана, након чега се узима костна срж и израђују и боје препарати[1, 2, 3, 4, 5, 6, 7]. Приликом коришћења периферне крви, крв се узима у одговарајуће време након третмана и израђују се препарати размаза крви који се боје[4, 8, 9, 10]. Код истраживања са периферном крвљу време протекло од последњег излагања и убирања ћелија је што краће. Препарати се анализирају како би се утврдило постојање микронуклеуса.

1.4. ОПИС МЕТОДЕ

1.4.1. Припреме

1.4.1.1. Избор животињске врсте

У случају коришћења костне сржи препоручује се примена мишева и пацова, иако се могу користити и друге одговарајуће врсте сисара. У случају коришћења периферне крви препоручују се мишеви. Могу се користити и друге одговарајуће врсте сисара ако слезина те врсте не уклања еритроците са микронуклеусима или да је врста показала одговарајућу осетљивост за откривање агенса који изазивају структурне или нумеричке хромозомске аберације. Користе се младе, здраве животиње лабораторијских сојева који се генерално употребљавају. Приликом започињања истраживања одступање у телесној маси животиња треба да буде минимално и не веће од ± 20% просечне телесне масе сваког пола.

1.4.1.2. Услови чувања и исхране

Примењују се општи услови дати у Општем уводу, иако се настоји да се влажност одржава на нивоу од 50% до 60%.

1.4.1.3. Припрема животиња

Здраве, одрасле животиње насумично се групишу у контролну и третиране групе. Животиње се појединачно означавају. Животиње се аклиматизују на лабораторијске услове најмање пет дана. Кавези су такви да се могући утицаји сведу на минимум.

1.4.1.4. Припрема доза

Пре примене, чврсте испитиване супстанце се растварају или суспендују у одговарајућим вехикулумима и, уколико је потребно, разблажују. Течне испитиване супстанце могу директно да се примене или да се пре примене разблаже. Свежи препарати испитиване супстанце се одмах употребљавају, осим уколико подаци о стабилности показују да је чување прихватљиво.

1.4.2. Услови испитивања

1.4.2.1. Вехикулум

Вехикулум не сме да изазива токсичне ефекте при дозним нивоима у којима се примењује и не сме да постоји сумња да ће хемијски да реагује са испитиваном супстанцом. Уколико се примењују мање познати вехикулуми, њихово укључивање у испитивање се образлаже подацима који указују на њихову компатибилност. Кад год је могуће, препоручује се примена воденог вехикулума.

1.4.2.2. Контроле

Истовремене позитивне и негативне (вехикулум) контроле укључене су у свако испитивање и за сваки пол. Осим третирања испитиваном супстанцом, са животињама у контролним групама поступа се на исти начин као и са животињама у третираним групама.

Позитивне контроле треба да изазову стварање микронуклеуса *in vivo* при дозним нивоима за које се очекује да ће довести до уочљивог повећања у односу на негативну контролу. Дозе позитивне контроле бирају се тако да ефекти буду јасни, али да лицу која очитава резултате одмах не открију идентитет шифрираних микроскопских препарата (слајдова). Дозвољено је да се позитивна контрола примени путем који је различит од пута примене испитиване супстанце, и узорак се узима само једном. Може се узети у обзир примена позитивних контрола које припадају истој хемијској класи као и испитивана хемикалија. Примери супстанци које се користе као позитивне контроле:

Табела 1.

Супстанца	CAS бр.	EINECS бр
Етил метансулфонат	62-50-0	200-536-7
N-етил-N-нитрозоуреа	759-73-9	212-072-2
Митомицин *C*	50-07-7	200-008-6
Циклофосфамид	50-18-0	

Циклофосфамид монохидрат	6055-19-2	200-015-4
Триетиленмеламин	51-18-3	200-083-5

Негативне контроле, третиране само вехикулумом, са којима се поступа на исти начин као са групама обухваћеним третманом, обухваћене су сваким узорковањем, осим уколико су доступни подаци контроле из ранијих студија о варијабилности у оквиру врсте и фреквенцији ћелија са микронуклеусима. Уколико се на негативне контроле примењује једно узорковање, најпримеренije је време првог узорковања. Истовремено се користе и нетретиране контроле (контролни узроци), осим уколико постоје контролни подаци из претходних испитивања или објављени контролни подаци који доказују да одабран вехикулум не изазива штетне или мутагене ефекте.

Када се користи периферна крв може бити прихватљив и узорак узет пре третмана у својству негативне контроле (негативног контролног узорка), али само код краткотрајних истраживања периферне крви (нпр. 1 до 3 третмана), а када се добијени подаци налазе унутар очекиваног опсега с обзиром на ранију контролу.

1.5. ПОСТУПАК

1.5.1. Број и пол животиња

Свака третирана и контролна група обухвата најмање пет животиња истог пола на којима је могуће обавити анализу[11]. Уколико постоје подаци истраживања обављеног на истој врсти и истим путем излагања који доказују да не постоје значајније разлике међу половима у токсичности, довољно је да се испитивање обави код само једног пола. У случајевима у којима излагање људи хемикалијама може да буде специфично за пол, као на пример код неких фармацеутских агенаса, испитивање се обавља са животињама одговарајућег пола.

1.5.2. План третмана

Није могуће препоручити никакав стандардни план третмана (тј. један, два или више третмана у интервалима од 24 сата). Узорци добијени из продужених режима третмана прихватљиви су ако је доказан позитиван ефекат или, када је у питању негативно испитивање, ако је доказана токсичност или употребљена гранична доза и да је третирање настављено све до времена узорковања. Испитиване супстанце се могу давати у облику подељених доза, тј. у облику два третмана током истог дана у размаку од највише неколико сати, како би се олакшало давање велике запремине материјала.

Испитивање се може обавити на два начина:

а) Животиње се једном третирају испитиваном супстанцом. Узорци костне сржи узимају се најмање два пута, почевши најраније 24 сата након третмана, али најкасније 48 сати након третмана, уз примену одговарајућих интервала између узимања узорака. Узорковање пре истека периода од 24 сата након третмана потребно је образложити. Узорци периферне крви узимају се најмање два пута, почевши најраније 36 сати након третмана, уз примену одговарајућих интервала након узимања првог узорка, али не дуже од 72 сата након третмана. Уколико се потврди позитивна реакција приликом једног интервала узорковања, није потребно даље узорковање.

б) Уколико се примењује два или више третмана дневно (нпр. два или више третмана у интервалима од 24 сата), узорци се узимају једном, између 18 сати и 24 сата након коначног третмана када је у питању костна срж, и једном између 36 сати и 48 сати након коначног третмана у случају периферне крви[12].

Могу се додатно применити други интервали узорковања, када је то значајно.

1.5.3. Дозни нивои

Уколико се због недостатка доступних података обавља истраживање са циљем утврђивања опсега доза, наведено истраживање се обавља у истој лабораторији, уз коришћење исте врсте, соја, пола и режима испитивања као и у главном истраживању[13]. Уколико постоји токсичност, приликом првог узорковања користе се три дозна нивоа. Наведене дозе обухватају распон од максималне до ниске токсичности или ниво без токсичности. Приликом другог узорковања потребно је употребити само највишу дозу. Највиша доза токсичности дефинише се као доза услед које настају такви знакови токсичности да би виша доза проузроковала угињавање животиња. Супстанце специфичне биолошке активности у малим нетоксичним дозама (попут хормона и митогена) могу бити изузетак од критеријума за избор доза и тада се дозе процењују у зависности од случаја. Највиша доза се може дефинисати и као дозу која доводи до неких индикација токсичности у костној сржи (нпр. смањење удела незрелих еритроцита у укупном броју еритроцита у костној сржи или периферној крви).

1.5.4. Испитивање граничне дозе

Уколико у испитивању са једном дозом од најмање 2.000 mg/kg ТМ у једнократном третману или у облику два третмана током истог дана не настану никакви приметни токсични ефекти и уколико се на основу података о структурно сличним супстанцама не очекује генотоксичност, није потребно применити комплетно испитивање применом три дозна нивоа. За испитивања која трају до 14 дана гранична доза износи 2.000 mg/kg ТМ/дан, а за испитивања која трају дуже од 14 дана износи 1.000 mg/kg ТМ/дан. Очекивана изложеност људи може да укаже на потребу за применом више дозе у испитивању граничне дозе.

1.5.5. Примена доза

Испитивана супстанца обично се примењује интубацијом, и то коришћењем желучане сонде или одговарајуће интубационе каниле или интраперитонеалном ињекцијом. Могу се применити и остали путеви излагања уз образложење. Максимална запремина течности која се може дати путем сонде или ињекцијом у једном наврату зависи од величине

експерименталне животиње. Запремина не прелази 2 mL/100 g ТМ. Употребу већих запремина потребно је образложити. Изузев у случају иританаса и корозива код којих се ефекти испољавају при вишим концентрацијама, одступања у запремини треба да буду минимална подешавањем концентрације, а како би се обезбедила константна запремина при свим дозним нивоима.

1.5.6. Припремање узорака коштане сржи/крви

Ћелије костне сржи обично се добијају из бутне или голеничних костију одмах након лишавања живота на хуман начин. Ћелије се изолују из бутне кости и голенице, припремљене и обојене применом потврђених метода испитивања. Периферна крв се узима из репне вене или другог одговарајућег крвног суда. Крвне ћелије се одмах суправитално обоје[8, 9, 10] или се израде препарати у облику размаза који се затим обоје. Применом боје која је специфична за ДНК (нпр. акридин оранж[14] или Hoechst 33258 плус пиронин-Y[15]) могу се отклонити неки од недостатака везаних за примену ДНК-неспецифичних боја. Наведена предност не искључује примену уобичајених боја (нпр. Giemsa). Могу да се примене и додатни системи (нпр. целулозне плоче за отклањање нуклеусних ћелија[16]), ако је доказано како наведени системи на одговарајући начин функционишу приликом израде микронуклеусних препарата у лабораторији.

1.5.7. Анализа

Удео незрелих еритроцита у укупном броју еритроцита (незрели плус зрели) утврђује се за сваку животињу пребројавањем укупног броја од најмање 200 еритроцита за костну сржи и 1.000 еритроцита за периферну крв[17]. Све препарате, укључујући оне позитивне и негативне контроле, потребно је шифрирати пре микроскопске анализе. За сваку животињу најмање 2.000 незрелих еритроцита подвргава се анализи ради утврђивања појаве микронуклеусних незрелих еритроцита. Додатни подаци могу се добити пребројавањем зрелих еритроцита са микронуклеусима. Приликом анализирања микроскопских препарата, удео незрелих еритроцита према укупном броју еритроцита није мањи од 20% контролне вредности. Када се животиње непрекидно третирају током четири недеље или дуже, на појаву микронуклеуса може се испитати најмање 2.000 зрелих еритроцита по животињи. Системи за аутоматизовану анализу (анализа крвне слике и проточна цитометрија суспензије ћелија) представљају прихватљиве алтернативе мануелном оцењивању уколико су оправдани и валидирани.

2. ПОДАЦИ

2.1. ОБРАДА РЕЗУЛТАТА

Подаци који се односе на појединачне животиње наводе се табеларно. Животиња представља експерименталну јединицу. За сваку анализирану животињу засебно се наводи: број незрелих вреднованих еритроцита, број микронуклеусних незрелих еритроцита и укупан број незрелих еритроцита. Када се животиње непрекидно третирају током четири недеље или дуже, потребно је навести и податке о зрелим еритроцитима уколико се исти прикупљају. За сваку животињу се наводи однос између броја незрелих и укупног броја еритроцита и, уколико је потребно, проценат микронуклеусних еритроцита. Уколико не постоје докази о разликама међу половима, подаци добијени испитивањем оба пола могу се сјединити ради статистичке анализе.

2.2. ПРОЦЕНА И ТУМАЧЕЊЕ РЕЗУЛТАТА

Постоји неколико критеријума за утврђивање позитивног резултата, као што је дозно зависно повећање броја микронуклеусних ћелија или јасно повећање броја микронуклеусних ћелија у групи која је примала једну дозу, приликом једног интервала узорковања. Првенствено се узима у обзир биолошка релевантност резултата. Могу се применити статистичке методе као помоћно средство приликом процене резултата испитивања[18, 19]. Статистички значај не треба да буде једини фактор за утврђивање позитивне реакције. Двосмислени резултати се појашњавају даљим испитивањем, најбоље модификовањем експерименталних услова.

Испитивана супстанца за коју резултати не задовољавају горе наведене критеријуме, у овом испитивању сматра се немутагеном.

Иако већина експеримената даје јасно позитивне или негативне резултате, у ретким случајевима утврђени подаци не омогућавају доношење коначне одлуке о деловању испитиване супстанце. Резултати могу остати двосмислени или под знаком питања, без обзира на број обављених експеримената.

Позитивни резултати микронуклеус теста указују на то да супстанца изазива настајање микронуклеуса који су последица хромозомских оштећења или оштећења митотског система у еритробластима експерименталне врсте животиња. Негативни резултати указују на то да, под експерименталним условима, испитивана супстанца не изазива настанак микронуклеуса у незрелим еритроцитима експерименталне врсте животиња.

Потребно је размотрити вероватноћу да испитивана супстанца или њени метаболити доспеју у крвоток или, конкретно, до циљног ткива (нпр. системска токсичност).

3. ИЗВЕШТАЈ

Извештај о испитивању садржи податке о:

1) Вехикулуму:

– оправданост избора вехикулума;

– растворљивост и стабилност испитиване супстанце у вехикулуму, уколико су познати.

2) Експерименталним животињама:

– врста/соj;

– број, старост и пол животиња;

– извор, смештаj, исхрана, итд.;

– појединачна телесна маса животиња на почетку испитивања, укључујући распон телесне масе, средњу вредност и стандардну девијацију за сваку групу.

3) Условима испитивања:

– позитивна и негативна (вехикулум) контрола;

– подаци испитивања за утврђивање распона доза, уколико је обављено;

– образложење за избор дозних нивоа;

– детаљи припреме испитиване супстанце

– детаљи примене испитиване супстанце;

– образложење пута примене;

– методе за потврду чињенице да је испитивана супстанца доспела у системски крвоток или до циљног ткива, уколико је применљиво;

– начин прерачунавања концентрације испитиване супстанце у храни/води за пиће (ppm) у дозу (mg/kg ТМ/дан), уколико је применљиво;

– детаљи о квалитету хране и воде;

– детаљан опис распореда третмана и узорковања;

– методе припреме микроскопских плочица (слајдова);

– методе мерења токсичности;

– критеријум за вредновање микронуклеусних незрелих еритроцита;

– број анализираних ћелија по животињи;

– критеријум за сматрање испитивања као позитивног, негативног или двосмисленог.

4) Резултатима:

– знакови токсичности;

– удео незрелих еритроцита према укупном броју еритроцита;

– број микронуклеусних незрелих еритроцита, засебно дат за сваку животињу;

– средња вредност ± стандардна девијација броја микронуклеусних незрелих еритроцита по групама;

– однос доза – одговор, где је могуће;

– примењене статистичке анализе и методе;

– подаци негативне контроле из конкурентне студије и раније студије;

– подаци позитивне контролне из конкурентне студије.

5) Образложењу резултата.

6) Закључцима.

4. ЛИТЕРАТУРА

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. Iin: „Developments in Science and Practice of Toxicology", Ed. A.W. Hayes, R.C. Schnell and T.S. Miya, Elsevier, Amsterdam, p. 555-558.

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

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

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

9. The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test, (1992) Micronucleus Test with Mouse Peripheral Blood Erythrocytes by Acridine Orange Supravital Staining: The Summary Report of the 5th Collaborative Study by CSGMT/JEMMS. MMS. Mutation Res., p. 278, 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, generalised 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. Lovell, 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. МУТАГЕНОСТ: ИСПИТИВАЊЕ РЕВЕРЗНИХ МУТАЦИЈА НА БАКТЕРИЈАМА

1. МЕТОДА ИСПИТИВАЊА

Метода испитивања заснива се на Упутству за испитивање OECD 471, Испитивање Бактеријских Реверзних Мутација (1997).

1.1. УВОД

За испитивање бактеријских реверзних мутација користе се сојеви Salmonella-e typhimurium и Escherichia-e coli којима су неопходне аминокиселине, са циљем откривања тачкастих мутација које обухватају супституцију, адицију и делецију једног или неколико парова база ДНК[1, 2, 3]. Принцип испитивања бактеријских реверзних мутација је да детектује мутације које доводе до реверзије мутација присутних у испитиваним сојевима и тако обнављају функционалну способност бактерија да синтетишу есенцијалне аминокиселине. Реверзно мутиране бактерије могу се открити на основу њихове способности раста у одсуству аминокиселине која је потребна родитељском испитиваном соју.

Тачкасте мутације су узрок многих генетских обољења код људи и постоје знатни докази да тачкасте мутације у онкогенима и тумор-супресорским генима соматских ћелија учествују у настанку тумора код људи и експерименталних животиња. Испитивање бактеријских реверзних мутација је брзо, јефтино и релативно једноставно за извођење. Многи експериментални сојеви имају неколико својстава које их чине осетљивијим на откривање мутација, укључујући осетљиве секвенце ДНК на местима реверзије, повећану пропустљивост ћелија за веће молекуле и елиминацију система репарације ДНК или појачавања процеса репарације ДНК молекула склоних грешкама. Специфичност експерименталних сојева може да

пружи корисне податке о типу мутација које изазивају генотоксични агенси. Доступна је велика база резултата испитивања бактеријских реверзних мутација за велики број различитих структура и развијене су добро утемељене методологије за испитивање хемикалија са различитим физичким и хемијским својствима, укључујући испарљива једињења.

Видети Општи увод.

1.2. ДЕФИНИЦИЈЕ

Испитивање реверзне мутације на Salmonella typhimurium или на Escherichia coli открива мутацију у соју коме је неопходна аминокиселина (хистидин односно триптофан, редом) која производи сој који не зависи од спољашњег извора аминокиселине.

Мутагени који доводе до супституције базног пара (мутагени супституције базног пара) јесу агенси који изазивају промене база у ДНК. У испитивању реверзних мутација до ове промене може доћи на месту изворне мутације или на другом месту у бактеријском геному.

Мутагени који доводе до померања оквира читања (мутагени помака оквира) јесу агенси који изазивају адицију или делецију једног или више парова база у ДНК, мењајући тиме оквир очитавања РНК.

1.3. ПОЛАЗНА РАЗМАТРАЊА

За испитивање бактеријских реверзних мутација користе се прокариотске ћелије које се од ћелија сисара разликују у карактеристикама као што су: уношење, метаболизам, хромозомска структура и процеси репарације ДНК. Испитивања која се обављају *in vitro* обично захтевају употребу егзогеног извора метаболичке активације. Системи за *in vitro* метаболичку активацију не могу потпуно да опонашају *in vivo* услове код сисара. Испитивање не пружа директне податке о мутагеном и карциногеном потенцијалу супстанце код сисара.

Испитивање бактеријских реверзних мутација обично се примењује као иницијални скрининг за генотоксичну активност и, посебно, као активност која изазива појаву тачкастих мутација. Опсежна база података показала је да многе хемикалије које су у овом испитивању дале позитиван резултат показују мутагено деловање и у другим испитивањима. Постоје примери мутагених агенса који се не могу открити овим испитивањем. Разлози за ове недостатке могу се приписати специфичној природи ефекта који се детектује, разликама у метаболичкој активацији или у биорасположивости. Фактори који повећавају осетљивост испитивања бактеријских реверзних мутација могу да доведу до прецењивања мутагене активности.

Испитивање бактеријских реверзних мутација можда неће бити прикладно за процену одређених класа хемикалија, нпр. високо бактерицидних једињења (нпр. одређени антибиотици), као и оних за које се сматра (или је познато) да специфично интерферирају са системом репликације ћелија сисара (нпр. неки инхибитори топоизомеразе и неки аналози нуклеотида). У тим случајевима могу да буду примеренија испитивања мутација на ћелијама сисара.

Иако је мноштво једињења, која дају позитиван резултат у овом испитивању, карциногено за сисаре, повезаност није апсолутна. Она зависи од класе хемикалије, а постоје и карциногени који се не могу открити овим испитивањем због тога што делују посредством других механизама који нису генотоксични или путем механизама који не постоје у ћелијама бактерија.

1.4. ПРИНЦИП МЕТОДЕ

Суспензије бактеријских ћелија излажу се испитиваној супстанци у присуству и одсуству егзогеног система метаболичке активације. У оквиру методе инкорпорације у подлогу, наведене суспензије мешају се са надслојем агара и одмах се наносе на минималну количину подлоге. У методи преинкубације смеша за третман се инкубира, а затим меша са надслојем агара пре наношења на минималну количину подлоге. Код обе технике, након два или три дана инкубације, броје се ревертантне колоније и упоређују са бројем спонтаних ревертантних колонија на контролним подлогама са вехикулумом.

Описано је неколико поступака за извођење испитивања бактеријских реверзних мутација. Међу наведеним обично се користи метода инкорпорације у подлогу [1, 2, 3, 4], метода преинкубације[2, 3, 5, 6, 7, 8], метода флуктуације[9, 10] и метода суспензије[11]. Описане су и модификације намењене испитивању гасова или пара[12].

Поступци описани у методи испитивања првенствено се односе на методу инкорпорације у подлогу и методу преинкубације. Обе методе прикладне су за извођење експеримента са и без метаболичке активације. Неке супстанце се могу ефикасније открити применом методе преинкубације. Наведене супстанце припадају хемијским класама које укључују алифатичне нитрозамине кратког ланца, двовалентне метале, алдехиде, азо-боје и диазо једињења, пиролизидинске алкалоиде, алил једињења и нитро једињења[3]. Одређене класе мутагена не могу се увек детектовати коришћењем стандардних поступака, попут методе инкорпорације у подлогу или методе преинкубације. Наведене класе мутагена сматрају се „посебним случајевима" и за њихово откривање препоручује се коришћење алтернативних поступака. Могу се идентификовати следећи „посебни случајеви" (заједно с примерима поступака који се могу употребити за њихово откривање): азо-боје и диазо једињења[3, 5, 6, 13], гасови и испарљиве хемикалије[12, 14, 15, 16] и гликозиди[17, 18]. Одступање од стандардног поступка научно се оправдава.

1.5. ОПИС МЕТОДЕ

1.5.1. Припреме

1.5.1.1. Бактерије

Свеже културе бактерија се узгајају до касне експоненцијалне или ране стационарне фазе раста (приближно 10^9 ћелија по mL). Културе у касној стационарној фази се не употребљавају. Потребно је да културе које се користе током

експеримента садрже висок титар вијабилних бактерија. Титар се може показати или из кривих раста на основу података контроле из ранијих студија или у сваком испитивању утврђивањем броја вијабилних ћелија експериментом на подлози.

Препоручена температура инкубације износи 37° C.

Потребно је употребити најмање пет сојева бактерија. Сојеви обухватају четири соја S. typhimurium (TA1535; TA1537 или TA97a или TA97; TA98; и TA100) који су се показали као поуздани и репродуцибилни између лабораторија. Наведена четири соја S. typhimurium имају GC парове база на примарном месту реверзне мутације и познато је да они можда неће открити одређене оксидујуће мутагене, агенсе који доводе до унакрсног повезивања и хидразине. Овакве супстанце могу се открити помоћу сојева E. coli WP2 или S. typhimurium TA102[19] који имају AT базни пар на примарном месту реверзне мутације. Препоручена комбинација сојева је:

– S. typhimurium TA1535 и

– S. typhimurium TA1537 или TA97 или TA97a и

– S. typhimurium TA98 и

– S. typhimurium TA100 и

– E. coli WP2 uvrA или E. coli WP2 uvrA (pKM101) или S. typhimurium TA102.

Како би се открили мутагени који доводе до унакрсног повезивања, може бити потребно да се укључи TA102 или додати сој E. coli који је вичан у поправци ДНК (нпр. E. coli WP2 или E. coli WP2 (PKM101)).

Потребно је применити прихваћене поступке за припремање „stock" културе, верификацију маркера и чување. Потреба за аминокиселинама за раст демонстрира се за сваки препарат замрзнуте „stock" културе (за хистидином за сојеве S. typhimurium и триптофаном за сојеве E. coli). На сличан начин потребно је проверити остале фенотипске карактеристике, односно присуство или одсуство плазмида R-фактора ако је потребно (тј. резистенција на ампицилин код сојева TA98, TA100 и TA97a или TA97, WP2 uvrA и WP2 uvrA (pKM101) и резистенција на ампицилин + тетрациклин код соја TA102); постојање својствених мутација (тј. rfa мутација код S. typhimurium путем осетљивости на кристал-виолет и uvrA мутација код E. Coli или uvrB мутација код S. typhimurium, путем осетљивости на ултраљубичасту светлост)[2, 3]. Сојеви дају такав број спонтаних ревертантних колонија на подлогама који се налази у оквиру распона учесталости који се очекује на основу података из раније контроле лабораторије и који се по могућству налази унутар распона који се наводи у литератури.

1.5.1.2. Подлога

Примењује се одговарајући минимални агар (нпр. који садржи Vogel-Bonner-ову минималну подлогу „E" и глукозу) и надслој агара који садржи хистидин и биотин или триптофан који омогућава неколико деоба ћелија[1, 2, 9].

1.5.1.3. Метаболичка активација

Бактерије се излажу испитиваној супстанци и у присуству и у одсуству система метаболичке активације. Најчешће коришћен систем је постмитохондријална фракција са кофактором (S9) припремљена од јетре глодара третираних агенсима ензимске индукције попут Aroclor-а 1254[1, 2] или комбинације фенобарбитона и ß–нафтофлавона[18, 20, 21]. Постмитохондријална фракција обично се користи у концентрацијама у распону од 5% v/v до 30% v/v у облику S9-мешавине. Избор и услови система метаболичке активације могу да зависе од класе хемикалије која се испитује. У неким случајевима може да буде прикладно да се искористи више од једне концентрације постмитохондријалне фракције. За азо-боје и диазо-једињења може да се покаже примеренијом примена система редуктивне метаболичке активације[6, 13].

1.5.1.4. Испитивана супстанца/Препарат

Пре третирања бактерија, чврсте испитиване супстанце се растварају или суспендују у одговарајућим вехикулумима и, уколико је потребно, да се разблаже. Течне испитиване супстанце могу се директно додати испитиваним системима и/или се разблажити пре третирања. Свежи препарати испитиване супстанце употребљавају се одмах, осим уколико подаци о стабилности показују да је чување прихватљиво.

Не сме да постоји сумња да вехикулум хемијски реагује са испитиваном супстанцом. Вехикулум је компатибилан са преживљењем бактерија и S9 активношћу[22]. Уколико се примењују мање познати вехикулуми, њихово укључивање у испитивање се поткрепљује подацима који указују на њихову компатибилност. Кад год је могуће, препоручује се водени вехикулум. Приликом испитивања супстанци које су нестабилне у води, органски растварачи који се користе не смеју садржати воду.

1.5.2. Услови испитивања

1.5.2.1. Експериментални сојеви

Видети одељак 1.5.1.1. ове методе.

1.5.2.2. Концентрација којој се излажу бактерије

Међу критеријима који се узимају у обзир приликом утврђивања највеће количине испитиване супстанце која ће се применити је цитотоксичност и растворљивост у коначној смеши намењеној за примену.

Може да буде корисно да се утврди токсичност и растворљивост у прелиминарном експерименту. Цитотоксичност се може открити преко редукције броја ревертантних колонија, бистрењем или смањивањем позадине или степена преживљавања

третираних култура. Цитотоксичност неке супстанце може се променити услед присуства система метаболичке активације. Нерастворљивост је потребно оценити као преципитацију (таложење) у коначној мешавини под стварним експерименталним условима, а која је видљива голим оком.

Препоручена максимална испитивана концентрација за растворне супстанце које нису цитотоксичне износи 5 mg/подлога или 5 µL/подлога. За супстанце које нису цитотоксичне и које се не растварају при 5 mg/подлога или 5 µL/подлога, једна или више испитиваних концентрација треба да буде нерастворна у коначној смеши намењеној за третман. Испитиване супстанце које су циотоксичне већ при нивоима нижим од 5 mg/подлога или 5 µL/подлога испитују се све до цитотоксичне концентрације. Преципитат не сме да утиче на оцењивање (пребројавање).

Потребно је употребити најмање пет различитих концентрација испитиване супстанце (које је могуће анализирати) у интервалима од отприлике половине log (тј. √10) између тачака испитивања у иницијалном експерименту. Мањи интервали могу се показати прикладним приликом испитивања везе између концентрације и одговора. Испитивање концентрација изнад 5 mg/подлога или 5 µL/подлога може да се узме у обзир приликом вредновања супстанце које садрже значајне количине потенцијално мутагених нечистоћа.

1.5.2.3. Позитивне и негативне контроле

Свако испитивање укључује истовремене позитивне и негативне контроле (вехикуклум) специфичне за сој, са и без метаболичке активације. Потребно је одабрати концентрације позитивне контроле које ће показати ефикасно обављање сваког есеја.

За есеје са системом метаболичке активације, референтна супстанца позитивне контроле се бира на основу врсте бактеријских сојева који се користе.

Примери супстанци одговарајућих позитивних контрола за есеје са метаболичком активацијом:

Табела 1.

CAS бр.	EINECS бр.	Називи
781-43-1	212-308-4	9,10-диметилантрацен
57-97-6	200-359-5	7,12-диметилбензо[*а*]антрацен
50-32-8	200-028-5	бензо[*а*]пирен
613-13-8	210-330-9	2-аминоантрацен
50-18-0		циклофосфамид
6055-19-2	200-015-4	циклофосфамид монохидрат

Супстанца која представља одговарајућу позитивну контролу за методу редуктивне метаболичке активације:

Табела 2.

CAS бр.	EINECS бр	Називи
573-58-0	209-358-4	Конго црвено

2–аминоантрацен се не употребљава као једини индикатор ефикасности S9-смеше. Уколико се користи 2-аминоантрацен, сваки лот S9 такође носи обележје мутагена који захтева метаболичку активацију микрозомалним ензимима, нпр. бенз[а]пирен, диметилбензантрацен.

Супстанце дате у Табели 3 примери су позитивних контрола специфичних за сој за есеје који се спроводе без егзогеног система метаболичке активације:

Табела 3.

CAS бр.	EINECS бр.	Називи	Сој
26628-22-8	247-852-1	Натријум-азид	TA 1535 и TA 100
607-57-8	210-138-5	2-нитрофлуорен	TA 98
90-45-9	201-995-6	9-аминоакридин	TA 1537, TA 97 и TA 97a
17070-45-0	241-129-4	ICR 191	TA 1537, TA 97 и TA 97a
80-15-9	201-254-7	Кумен хидропероксид	TA 102
50-07-7	200-008-6	митомицин *C*	WP2 uvrA и TA102
			WP2, WP2uvrA и

70-25-7	200-730-1	*N*-етил-*N*-нитро-*N*- нитрозогванидин	WP2uvrA(pKM101)
56-57-5	200-281-1	4-нитрохинолин-1-оксид	WP2, WP2uvrA и WP2uvrA (pKM101)
3688-53-7		Фурилфурамид (AF2)	сојеви који садрже плазмид

Могу се користити и друге референтне супстанце као позитивне контроле. Узима се у обзир употреба хемикалије сродне класе као позитивна контрола, када је доступна.

Потребно је укључити негативне контроле које се састоје само од вехикулума, без испитиване супстанце и са којима се поступа на исти начин као и са третираним групама. Потребно је корстити нетретиране контроле, осим уколико постоје контролни подаци из ранијих студија који показују да изабрани вехикулум не доводи до штетних или мутагених ефеката.

1.5.3. Поступак

Код методе инкорпорације у подлогу[1, 2, 3, 4] без метаболичке активације, обично се 0,05 mL или 0,1 mL испитиваних раствора, 0,1 mL свеже бактеријске културе (која садржи отприлике 10^8 вијабилних ћелија) и 0,5 mL стерилног пуфера помеша са 2,0 mL надслоја агара. За есеј са метаболичком активацијом, обично се 0,5 mL смеше за метаболичку активацију, која садржи одговарајућу количину постмитохондријалне фракције (у распону од 5% v/v до 30% v/v у смеши за метаболичку активацију) меша с надслојем агара (2,0 mL) заједно с бактеријама и испитиваном супстанцом/испитиваним раствором. Садржај сваке епрувете измеша се и прелије преко површине минималне агар храњиве подлоге. Надслој агара оставља се како би се стврднуо пре инкубације.

Код методе преинкубације[2, 3, 5, 6] испитивана супстанца/испитиван раствор се преинкубира заједно с испитиваним сојем (који садржи отприлике 10^8 вијабилних ћелија) и стерилним пуфером или системом метаболичке активације (0,5 mL), обично у трајању од 20 минута или дуже, при температури од 30° C до 37° C, а пре мешања с надслојем агара и преливања преко површине минималне агар подлоге. Обично се 0,05 mL или 0,1 mL испитиване супстанце/испитиваног раствора, 0,1 mL бактерија и 0,5 mL S9-смеше или стерилног пуфера помеша са 2,0 mL надслоја агара. Епрувете се током преинкубационог периода снабдевају ваздухом, применом уређаја за мућкање.

Потребно је да се примене по три подлоге за сваки дозни ниво у циљу одговарајуће процене варијабилности. Прихватљиво је да се примене по две подлоге у случајевима када је то научно оправдано. Повремени губитак подлоге не чини нужно есеј неважећим.

Гасовите и испарљиве супстанце потребно је испитивати помоћу одговарајућих метода, нпр. у запечаћеним судовима[12, 14, 15, 16].

1.5.4. Инкубација

Све подлоге у одређеном испитивању се инкубирају на температури од 37 °C током 48 до 72 сата. Након периода инкубације пребројава се број ревертантних колонија по подлози.

2. ПОДАЦИ

2.1. ОБРАДА РЕЗУЛТАТА

Подаци се наводе у облику броја ревертантних колонија по подлози. Наводи се број ревертантних колонија на подлогама негативне (контрола са вехикулумом и нетретирана контрола, уколико су примењене) и позитивне контроле. Потребно је навести број и средњу вредност реветрантних колонија по подлози и стандардну девијацију за испитивану супстанцу и позитивне и негативне (нетретиране и/или вехикулум) контроле.

Не постоји потреба за верификовањем јасно позитивне реакције. Ако се добију двосмислени резултати, разјашњавају се у даљим испитивањима, најбоље модификовањем експерименталних услова. Негативне резултате потребно је потврдити у зависности од случаја. У случајевима у којима се потврда негативних резултата не сматра неопходном, даје се образложење. У наредним експериментима потребно је размотрити модификацију параметара испитивања с циљем проширења опсега оцењиваних услова. Параметри испитивања које је могуће модификовати обухватају размак између концентрација, методу третмана (инкорпорација у подлогу или течна преинкубација) и услове метаболичке активације.

2.2. ПРОЦЕНА И ТУМАЧЕЊЕ РЕЗУЛТАТА

Постоји неколико критеријума за утврђивање позитивног резултата, као што је повећање у зависности од концентрације у оквиру испитиваног опсега и/или репродуцибилног повећања броја ревертантних колонија по подлози при једној или више концентрација, код најмање једног соја, са или без система метаболичке активације[23]. Првенствено се узима у обзир биолошки значај резултата. Могу да се примене статистичке методе као помоћ приликом оцењивања резултата испитивања[24]. Статистички значај не треба да буде једини чинилац помоћу кога се утврђује позитивни одговор.

Испитивана супстанца за коју резултати не задовољавају горе наведене критеријуме сматра се немутагеном у овом испитивању.

Иако већина експеримената даје јасне позитивне или негативне резултате, у ретким случајевима утврђени подаци не омогућавају доношење коначног суда о деловању испитиване супстанце. Резултати могу да остану двосмислени или под знаком питања, без обзира колико се пута експеримент понови.

Позитивни резултати испитивања бактеријских реверзних мутација указују на то да супстанца узрокује тачкасте мутације супституцијом базе или померањем оквира читања у геному код Salmonella typhimurium односно Escherichia coli. Негативни резултати указују на то да, под експерименталним условима, испитивана супстанца не изазива мутагене промене код експериментне врсте.

3. ИЗВЕШТАЈ

Изветај о испитивању садржи податке о:

1) Вехикулуму:

– образложење избора вехикулума;

– растворљивост и стабилност испитиване супстанца у вехикулуму, уколико су познати.

2) Сојевима:

– употребљени сојеви;

– број ћелија по култури;

– карактеристике соја.

3) Условима испитивања:

– количина испитиване супстанце по подлози (mg/подлога или µL/подлога) с образложењем за избор дозе и број подлога по концентрацији;

– употребљена подлога;

– тип и састав система метаболичке активације, укључујући критеријуме прихватљивости;

– поступци третмана.

4) Резултатима:

– знакови токсичности;

– знакови преципитације;

– број за појединачне подлоге;

– просечан број ревертантних колонија по подлози и стандардна девијација;

– однос доза – одговор, ако је могуће;

– статистичке анализе, уколико постоје;

– подаци негативне (вехикулум) и позитивне контроле из конкурентне студије, са опсезима, средњим вредностима и стандардним девијацијама;

– подаци негативне (вехикулум) и позитивне контроле из раније студије, са опсезима средњим вредностима и стандардним девијацијама;

5) Образложењу резултата.

6) Закључцима.

4. ЛИТЕРАТУРА

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) Vaporisation 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., p. 88343-350.

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. ИСПИТИВАЊЕ МУТАГЕНОСТИ И СКРИНИНГ ЗА ГЕНСКЕ МУТАЦИЈЕ КАРЦИНОГЕНОСТИ- SACCAHAROMYCES CEREVISIAE

1. МЕТОДА ИСПИТИВАЊА

1.1. УВОД

Видети Општи увод.

1.2. ДЕФИНИЦИЈЕ

Видети Општи увод.

1.3. РЕФЕРЕНТНЕ СУПСТАНЦЕ

Нису прописане.

1.4. ПРИНЦИП МЕТОДЕ

Мерење продукције генских мутација изазваних хемијским агенсима са и без метаболичке активације може да се изводи

на више хаплоидних и диплоидних сојева квасца Saccharomyces cerevisiae.

Користе се рани системи мутације код хаплоидних сојева, попут мерења мутације од црвених мутаната зависних од аденина (*ade*-1, *ade*-2) до белих мутаната двоструко зависних од аденина и селективни системи попут индукције резистенције на канавнаин и циклохексимид.

Најобимније валидиран систем реверзних мутација укључује примену хаплоидног соја HV 185-14C који носи окер nonsense мутације *ade* 2-1, *arg* 4-17, *lys* 1-1 и *trp* 5-48, које су реверзибилне мутагенинима супституције база који изазивају мутације специфичних локација или мутације окер супресора. HV 185-14C такође носи маркер *his* 1-7, missense мутацију која се реверзно мутира углавном кроз мутације на другој локацији, као и маркер *hom* 3-10 кога реверзно мутирају мутагени помака оквира читања.

У диплоидним сојевима S. cerevisiae једини сој који има широку примену је D7 који је хомозиготан за ilv 1-92.

1.5. КРИТЕРИЈУМИ КАВАЛИТЕТА

Нису прописани.

1.6. ОПИС МЕТОДЕ

1.6.1. Припреме

Раствори испитиваних хемикалија и контрола припремају се непосредно пре испитивања, уз примену одговарајућег вехикулума. Када су у питању органска једињења која нису растворна у води, не употребљава се раствор јачи од 2% v/v за органске растваваче као што су етанол, ацетон или диметилсулфоксид (DMSO). Коначна концентрација вехикулума не треба у значајној мери да утиче на ћелијску вијабилност и својства раста.

1.6.1.1. Метаболичка активација

Ћелије се излажу испитиваним хемикалијама и у присуству и у одсуству одговарајућег егзогеног система метаболичке активације.

Најчешће коришћен систем јесте постмитохондријална фракција са кофактором припремљена од јетре глодара претходно третираних агенсима ензимске индукције. За метаболичку активацију може бити прихватљива примена и других врста, ткива, постмитохондријалних фракција или поступака.

1.6.2. Услови испитивања

1.6.2.1. Експериментални сојеви

Хаплоидни сој HV 185-14C и диплоидни сој D7 су сојеви који се најчешће примењују у испитивањима генских мутација. Могу да одговарају и други сојеви.

1.6.2.2. Подлоге

Ради утврђивања преживљавања и броја мутаната користе се одговарајуће подлоге за култивисање.

1.6.2.3. Примена позитивних и негативних контрола

Потребно је истовремено извести позитивне, нетретиране и контроле вехикулума. За сваки посматрани специфични ефекат мутације примењују се одговарајуће хемикалије позитивне контроле.

1.6.2.4. Концентрација излагања

Потребно је употребити најмање пет одговарајуће распоређених концентрација испитиване супстанце. Највиша испитивана концентрација токсичних супстанци не сме да смањи преживљење испод 5% до 10%. Супстанце које су релативно нерастворне у води испитују се до границе растворљивости, уз примену одговарајућих поступака. За нетоксичне супстанце које се лако растварају у води горња граница концентрације се одређује у зависности од случаја.

1.6.2.5. Услови инкубације

Подлоге се инкубирају од четири до седам дана на температури од 28° C до 30° C на тамном месту.

1.6.2.6. Фреквенција спонтаних мутација

Потребно је да се користе субкултуре код којих је фреквенца спонтаних мутација у оквиру прихваћеног нормалног опсега.

1.6.2.7. Број репликата

Неопходно је да се примене најмање три подлоге по концентрацији за есеј прототрофа насталих услед генске мутације и за вијабилност ћелија. У случају експеримента који користе маркере као што је hom 3–10 са ниским стопом мутација, број хранљивих подлога се повећава како би се добили статистички релевантни подаци.

1.6.3. Поступак

Третирање сојева S. cerevisiae обично се обавља у поступку испитивања у течној подлози који обухвата ћелије у фази мировања или ћелије у расту. Иницијални експерименти се изводе на ћелијама у расту: 1–5 x 10^7 ћелија/mL излаже се

испитиваној хемикалији до 18 сати на температури од 28° C до 37° C уз мешање. Током третмана додаје се одговарајућа количина система метаболичке активације када је прикладно. На крају третмана ћелије се центрифугирају, испирају и засејавају на одговарајућу подлогу. Након инкубације, подлоге се оцењују на преживљавање и индукцију генских мутација.

Уколико је први експеримент негативан, други експеримент се изводи уз примену ћелија у фази мировања. Уколико је први експеримент позитиван, потврђује се обављањем одговарајућег независног експеримента.

2. ПОДАЦИ

Подаци се наводе табеларно. Наводи се: број избројаних колонија, број мутаната, преживљавање и учесталост мутација. Све резултате потребно је потврдити у независном експерименту. Подаци се процењују применом одговарајућих статистичких метода.

3. ИЗВЕШТАЈ

3.1. ИЗВЕШТАЈ О ИСПИТИВАЊУ

Извештај о испитивању, уколико је могуће, садржи податке о:

– употребљеном соју;

– условима испитивања: фаза мировања или ћелије у расту, састав подлоге, температура инкубације и трајање, систем метаболичке активације;

– условима третирања: нивои излагања, поступак и трајање третмана, температура на којој се изводи, позитивне и негативне контроле;

– броју избројаних колонија, број мутаната, преживљавање и учесталост мутаната, однос доза – одговор, уколико је могуће, статистичку процену података;

– образложењу резултата,

– тумачењу резултата.

3.2. ПРОЦЕНА И ТУМАЧЕЊЕ РЕЗУЛТАТА

Видети Општи увод.

4. ЛИТЕРАТУРА

Видети Општи увод.

B.16. МИТОТСКА РЕКОМБИНАЦИЈА – SACCAROMYCES CEREVISIAE

1. МЕТОДА ИСПИТИВАЊА

1.1. УВОД

Видети Општи увод.

1.2. ДЕФИНИЦИЈЕ

Видети Општи увод.

1.3. РЕФЕРЕНТНЕ СУПСТАНЦЕ

Нису прописане.

1.4. ПРИНЦИП МЕТОДЕ

Митотска рекомбинација код Saccaromyces cerevisiae може се открити између гена (или обично између гена и његове центромере), као и унутар гена. Први наведени догађај назива се митотским кросинговером (crossing-over) и ствара реципрочне производе, док други догађај најчешће није реципрочан и назива се конверзијом гена. Кросинговер се обично испитује на основу стварања рецесивних хомозиготних колонија или сектора створених у хетерозиготном соју, док се конверзија гена испитује на основу стварања прототрофних ревертаната који настају у ауксотрофном хетероалелном соју који носи два различита дефектна алела истог гена. Најчешће коришћени сојеви намењени откривању митотске конверзије гена су: D_4 (хетероалел на *ade* 2 и trp 5), D_7 (хетероалел на *trp* 5), BZ_{34} (хетероалел на *arg* 4) и JDl (хетероалел на *his* 4 и *trp* 5). Митотски кросинговер који ствара црвене и ружичасте хомозиготне секторе може да се анализира код D_5 или D_7 (чиме се уједно мери митотска конверзија гена и реверзна мутација на *ilv* 1-92), при чему су оба соја хетероалелна за комплементарне алеле *ade* 2.

1.5. КРИТЕРИЈУМИ КВАЛИТЕТА

Нису прописани.

1.6. ОПИС МЕТОДЕ

1.6.1. Припрема

Раствори испитиваних хемикалија и контролних или референтних једињења припремају се непосредно пре испитивања, уз примену одговарајућег вехикулума. Када су у питању органска једињења који нису растворљива у води, не употребљава се раствор јачи од 2% v/v органских растварача као што су етанол, ацетон или диметилсулфоксид (DMSO). Коначна концентрација вехикулума не сме у значајној мери да утиче на ћелијску вијабилност и својства раста ћелија.

1.6.1.1. Метаболичка активација

Ћелије се излажу испитиваним хемикалијама и у присуству и у одсуству одговарајућег егзогеног система метаболичке активације. Најчешће коришћен систем је постмитохондријална фракција са кофактором, припремљена од јетре глодара претходно третираних агенсима који индукују ензиме. За метаболичку активацију могу да се примене и друге врсте, ткива, постмитохондријалне фракције или поступци.

1.6.2. Услови испитивања

1.6.2.1. Експериментални сојеви

Најчешће се примењују сојеви диплоиди D_4 , D_5 , D_7 и JD1. Могу да се користе и други сојеви.

1.6.2.2. Подлога

За одређивање преживљавања и учесталости митотске рекомбинације користе се одговарајуће подлоге.

1.6.2.3. Употреба позитивних и негативних контрола

Истовремено је потребно изводити позитивне, нетретиране и контроле вехикулума. Примењују се одговарајуће хемикалије позитивне контроле за сваки специфични показатељ испитивања рекомбинације.

1.6.2.4. Концентрације излагања

Потребно је употребити најмање пет одговарајуће распоређених концентрација испитиване супстанце. Међу факторима који се узимају у обзир налазе се цитотоксичност и растворљивост. Најнижа концентрација не сме да има ефекат на вијабилност ћелија. Највиша испитивана концентрација токсичних хемикалија не сме да смањи преживљење испод 5% до 10%. Хемикалије које су релативно нерастворне у води испитују се до њихове границе растворљивости уз примену одговарајућих поступака. За нетоксичне супстанце које се лако растварају у води горња граница концентрације одређује се у зависности од случаја.

Ћелије могу да се изложе испитиваним хемикалијама у фази мировања или током раста у трајању до 18 сати. За дуготрајне третмане културе се микроскопски прегледају на формирање спора, чије постојање чини испитивање неважећим.

1.6.2.5. Услови инкубације

Подлоге се инкубирају на тамном месту, од четири до седам дана, на температури од 28° C до 30° C. Подлоге које се користе за испитивање црвених и ружичастих хомозиготних сектора који су настали митотским кросинговером држе се у фрижидеру (на температури око 4° C) током једног до два дана пре оцењивања, а како би се омогућио развој одговарајућих пигментованих колонија.

1.6.2.6. Учесталости спонтане митотске рекомбинације

Користе се субкултуре са учесталошћу спонтаних мутација митотске рекомбинације у оквиру прихваћеног нормалног опсега.

1.6.2.7. Број репликата

За испитивање прототрофа насталих услед митотске конверзије гена и за вијабилност ћелија неопходно је применити најмање три подлоге по концентрацији. У случају испитивања рецесивних хомозигота које настају митотским кросинговером, потребно је повећати број подлога како би се обезбедио одговарајући број колонија.

1.6.3. Поступак

Третирање сојева S. Cerevisiae обично се обавља поступком у течној подлози који укључује ћелије у фази мировања или ћелије у расту. Претходни експерименти се обављају на ћелијама у расту: 1-5 x 10^7 ћелија/mL излаже се испитиваној хемикалији до 18 сати на температури од 28° C до 37° C уз мешање. Током третмана додаје се одговарајућа количина система за метаболичку активацију, када је прикладно.

На крају третмана ћелије се центрифугирају, испирају и засејавају на одговарајуће подлоге за култивисање. Након инкубације, хранљиве подлоге се оцењују на преживљење и индукцију митотске рекомбинације.

Уколико је први експеримент негативан, обавља се други експеримент уз примену ћелија у фази мировања. Уколико је први експеримент позитиван, овај резултат се потврђује у независном експерименту.

2. ПОДАЦИ

Подаци се наводе табеларно. Наводи се: број избројаних колонија, број рекомбинаната, преживљење и фреквенца рекомбинаната.

Потребно је потврдити резултате у независном експерименту.

Подаци се процењују применом одговарајућих статистичких метода.

3. ИЗВЕШТАЈ

3.1. ИЗВЕШТАЈ О ИСПИТИВАЊУ

Извештај о испитивању, уколико је могуће, садржи податке о:

– употребљеном соју;

– условима испитивања: стационарна фаза или ћелије у расту, састав подлоге, температура инкубације и трајање, систем метаболичке активације;

– условима третирања: концентрација којој су ћелије изложене, поступак и трајање третмана, температура, позитивне и негативне контроле;

– броју избројаних колонија, број рекомбинаната, преживљење и учесталост рекомбинације, однос доза-одговор, уколико је могуће, статистичка процена података;

– образложењу резултата;

– тумачењу резултата.

3.2. ПРОЦЕНА И ТУМАЧЕЊЕ РЕЗУЛТАТА

Видети Општи увод.

4. ЛИТЕРАТУРА

Видети Општи увод.

B.17. МУТАГЕНОСТ – *IN VITRO* ИСПИТИВАЊЕ ГЕНСКЕ МУТАЦИЈЕ НА ЋЕЛИЈАМА СИСАРА

1. МЕТОДА ИСПИТИВАЊА

Ова метода заснива се на Упутству за испитивање OECD 476, *In vitro* испитивање генских мутација на ћелијама сисара (Mammalian Cell Gene Mutation Test) (1997).

1.1. УВОД

За откривање генских мутација изазваних хемијским супстанцама може се користити испитивање генских мутација на ћелијама сисара *in vitro*. Одговарајуће ћелијске линије обухватају L5178Y ћелије мишјег лимфома, CHO, CHO-AS52 и V79 линије ћелија кинеског хрчка и TK6 ћелије хуманог лимфобласта[1]. У овим ћелијским линијама најчешће посматрани генски показатељи мере мутацију на тимидин кинази (у даљем тексту: TK) и хипоксантин-гванин фосфорибозил трансферази (у даљем тексту: HPRT) и трансгену за ксантин-гванин фосфорибозил трансферазу (у даљем тексту: XPRT). Испитивања мутација на TK, HPRT и XPRT откривају различите спектре генетских појава. Аутозомална локација TK и XPRT може да омогући откривање генетских појава (нпр. великих делеција), а које нису откривене на HPRT локусу на X-хромозомима[2, 3, 4, 5, 6].

In vitro испитивање генске мутације на ћелијама сисара могу да се изводе на културама дефинисаних ћелијских линија или ћелијских сојева. Ћелије које се употребљавају бирају се на основу способности раста у култури и стабилности учесталости спонтаних мутација.

Испитивања која се обављају *in vitro* генерално захтевају примену егзогеног извора метаболичке активације. Овај систем метаболичке активације не може у потпуности да опонаша *in vivo* услове код сисара. Потребно је да се избегавају услови који доводе до резултата који не осликавају интринзичну мутагеност. Услед промена pH, осмолалности или високих нивоа цитотоксичности могу да настану позитивни резултати који не осликавају интринзичну мутагеност[7].

Наведено испитивање користи се за откривање могућих мутагена и карциногена за сисаре. Многа једињења која дају позитиван резултат у овом испитивању карциногени су за сисаре; међутим, међусобна зависност између овог испитивања и карциногености није беспрекорна. Корелација зависи од класе хемикалије и има све више доказа да постоје карциногени који се не могу открити овим испитивањем због тога што делују путем других, негенотоксичних механизама или механизама који не постоје у бактеријским ћелијама[6].

Видети Општи увод.

1.2. ДЕФИНИЦИЈЕ

Напредна директна мутација јесте генска мутација из родитељског типа у мутирани облик која доводи до измене или губитка ензимске активности или функције кодираног протеина.

Мутагени супституције базног пара јесу супстанце које доводе до супституције једног или неколико парова база у ДНК.

Мутагени помака оквира јесу супстанце које доводе до адиције или делеције једног или више парова база у молекулу ДНК.

Време експресије фенотипа јесте временски период током кога непромењени генски производи бивају одстрањени из новомутираних ћелија.

Фреквенца мутаната јесте број примећених мутираних ћелија подељен бројем вијабилних ћелија.

Релативни укупни раст јесте повећање броја ћелија током времена у поређењу с контролном популацијом ћелија. Израчунава се као производ раста у суспензији у односу на време ефикасности клонирања негативне контроле и у односу на негативну контролу.

Релативни раст у суспензији јесте повећање броја ћелија током периода експресије у односу на негативну контролу.

Вијабилност јесте ефикасност клонирања третираних ћелија у време засејавања у селективним условима након периода експресије.

Преживљавање јесте ефикасност клонирања третираних ћелија након што се исте засеју на подлогу на крају периода третмана. Преживљавање се обично изражава у односу на преживљење контролне популације ћелија.

1.3. ПРИНЦИП МЕТОДЕ

Ћелије без тимидин киназе (у даљем тексту: ТК) су због мутације $ТК^{+/-}$ > $ТК^{-/-}$ отпорне на цитотоксичне ефекте аналога пиримидина трифлуоротимидина (у даљем тексту: TFT). Ћелије с тимидин киназом осетљиве су на TFT који инхибира ћелијски метаболизам и заустављa даљу деобу ћелија. Због тога мутиране ћелије могу да се размножавају у присуству TFT-а, док нормалне ћелије, које садрже тимидин киназу, не могу. Слично се ћелије без HPRT-а или XPRT-а селектују по отпорности на 6-тиогванин (у даљем тексту: TG) или 8-азагванин (у даљем тексту: AG). Својства испитиване супстанце пажљиво се разматрају уколико се у било којем испитивању генске мутације у ћелијама сисара испитује аналог базе или једињење сродно селективном агенсу. На пример, потребно је истражити сваку селективну токсичност на коју се сумња да постоји код испитиване супстанце, а у односу на мутиране и немутиране ћелије. Потребно је потврдити ефикасност селекцијског система/агенса, а када се испитују хемикалије које су структурно сродне селективном агенсу[8].

Ћелије у суспензији или једнослојној култури излажу се испитиваној супстанци са и без метаболичке активације, током одговарајућег временског периода и субкултивишу се како би се утврдила цитотоксичност и како би се омогућила фенотипска експресија пре селекције мутаната[9, 10, 11, 12, 13]. Цитотоксичност се обично утврђује мерењем релативне ефикасности клонирања (преживљење) или релативног укупног раста култура након периода третирања. Третиране културе одржавају се у подлози за раст током довољног временског периода, које је карактеристично за сваки изабрани локус и врсту ћелија, а како би се омогућила скоро оптимална фенотипска експресија индукованих мутација. Фреквенца мутаната утврђује се засејавањем познатог броја ћелија у подлози која садржи селективни агенс, како би се детектовале мутиране ћелије, као и у подлози без селективног агенса како би се утврдила ефикасност клонирања (вијабилност). Након одговарајућег времена инкубације колоније се преброје. Фреквенца мутација израчунава се из броја мутираних колонија у селективној подлози и броја колонија у неселективној подлози.

1.4. ОПИС МЕТОДЕ

1.4.1. Припреме

1.4.1.1. Ћелије

За примену у овом испитивању на располагању је више врста ћелија, укључујући и суклонове ћелија L5178Y, CHO, CHO-AS52, V79 или TK6. За врсту ћелија које се користе у овом испитивању треба да је доказана осетљивост на хемијске мутагене, висока ефикасност клонирања и стабилна учесталост појаве спонтаних мутаната. Потребно је проверити да ћелије нису контаминиране микоплазмом и уколико су контаминиране не смеју се употребити.

Испитивање је дизајнирано тако да има унапред одређену осетљивост и потенцијал. Број употребљених ћелија, култура и концентрација испитиване супстанце осликава наведене дефинисане параметре[14]. Најмањи број вијабилних ћелија које преживе третман и број оних које се употребљавају у свакој фази експеримента заснива се на учесталости спонтаних мутација. Препорука је да се употреби онолики број ћелија који је најмање једнак десетеструкој реципрочној вредности учесталости спонтаних мутација. Препоручује се примена најмање 10^6 ћелија. Треба да су доступни одговарајући подаци о ћелијском систему из раније студије како би указали на конзистентност испитивања.

1.4.1.2. Подлоге и услови култивисања

Употребљавају се одговарајуће подлоге и услови инкубације (посуде за културе, температура, концентрација CO_2 и влажност). Подлоге се бирају у зависности од селективног система и врсте ћелија које се употребљавају у испитивању. Посебно је важно изабрати услове култивисања који обезбеђују оптималан раст ћелија током раздобља експресије и способност формирања колонија мутираних и немутираних ћелија.

1.4.1.3. Припремање култура

Ћелије се размноже из почетних култура, засеју на подлогу и инкубирају на температури од 37 °C. Пре употребе у овом испитивању можда ће из култура бити потребно одстранити већ постојеће мутиране ћелије.

1.4.1.4. Метаболичка активација

Ћелије је потребно изложити испитиваној супстанци и у присуству и у одсуству одговарајућег система метаболичке активације. Најчешће коришћен систем је постмитохондријална фракција са кофактором (S9), припремљена од јетре глодара третираних агенсима који индукују ензиме попут Aroclora 1254[15, 16, 17, 18] или комбинације фенобарбитона и ß–нафтофлавона[19, 20].

Постмитохондријална фракција обично се користи у концентрацијама у распону од 1% v/v до 10% v/v у коначној

подлози за испитивање. Избор и стање система метаболичке активације могу да зависи од класе хемикалије која се испитује. У неким случајевима може бити прикладно да се користи више од једне концентрације постмитохондријалне фракције.

Низ развојних промена, укључујући конструисање генетским инжињерингом ћелијских линија са експресијом специфичних активишућих ензима, могу да обезбеде могућност за ендогену активацију. Избор употребљених ћелијских линија треба да буде научно утемељен (нпр. на основу значаја изоензима цитохрома P450 за метаболизам испитиване супстанце).

1.4.1.5. Испитивана супстанца/Препарат

Чврсте испитиване супстанце се растварају или суспендују у одговарајућим растварачима или вехикулумима и, уколико је потребно, разблажују пре третирања ћелија. Течне испитиване супстанце могу директно да се додају експерименталним системима односно да се разблаже пре третирања. Свежи препарати испитиване супстанце одмах се употребљавају, осим уколико подаци о стабилности показују да је чување прихватљиво.

1.4.2. Услови испитивања

1.4.2.1. Вехикулум

Не сме да постоји сумња да ће растварач/вехикулум хемијски да реагује са испитиваном супстанцом. Растварач/вехикулум је компатибилан са преживљењем ћелија и активношћу S9. Уколико се примењују растварачи/вехикулуми која нису познати, њихово укључивање у испитивање се поткрепљује подацима који указују на њихову компатибилност. Кад год је могуће, препоручује се да се прво узме у обзир примена воденог растварача/вехикулума. Приликом испитивања супстанце које су нестабилне у води, органски растварачи који се користе не смеју да садрже воду. Вода се може одстранити додавањем молекуларног сита.

1.4.2.2. Концентрације излагања

Међу критеријумима које је потребно узети у обзир приликом утврђивања највише концентрације су: цитотоксичност, растворљивост у испитиваноме систему и промене у pH и осмолалности.

Цитотоксичност је потребно утврдити са и без метаболичке активације у главном експерименту уз примену одговарајућег показатеља ћелијског интегритета и раста, као што је релативна ефикасности клонирања (преживљавање) или релативни укупни раст. Може да буде корисно да се одреди цитотоксичност и растворљивост у прелиминарном експерименту.

Употребљава се најмање четири концентрације које се могу анализирати. Када постоји цитотоксичност, наведене концентрације обухватају распон од максималне до ниске или без токсичности. Ово најчешће значи да разлика међу нивоима концентрација не треба да буде већа од фактора између √2 и √10. Уколико се највиша концентрација темељи на цитотоксичности, тада за последицу има релативно преживљење (релативну ефикасност клонирања) или релативни укупни раст од око 10% до 20% (али не мање од 10%). За релативно нецитотоксичне супстанце највиша испитивана концентрација је 5 mg/mL 5 µL/mL, или 0,01 M, у зависности од тога која концентрација је нижа.

Релативно нерастворне супстанце се испитују до или изнад њихове границе растворљивости у условима култивисања. Доказе нерастворљивости потребно је утврдити у коначној подлози за третирање коме су изложене ћелије. Може да буде корисно да се растворљивост процени на почетку и на крају третмана, с обзиром да растворљивост може да се промени током излагања у испитиваном систему, услед присутности ћелија, S9, серума, итд. Нерастворљивост се може открити голим оком. Преципитат не сме да утиче на пребројавање.

1.4.2.3. Контроле

У сваки експеримент се укључују истовремене позитивне и негативне (растварач или вехикулум) контроле, са и без метаболичке активације. Када се користи метаболичка активација, хемикалија позитивне контроле је она којој је за мутагени одговор потребна активација.

Примери супстанци позитивне контроле:

Табела 1.

Стање метаболичке активације	Локус	Супстанца	CAS бр.	EINECS бр.
Нема егзогене метаболичке активације	HPRT	етил метансулфонат	62-50-0	200-536-7
		етил нитрозоурја	759-73-9	212-072-2
	TK (мале и велике колоније)	метил метансулфонат	66-27-3	200-625-0
	XPRT	етил метансулфонат	62-50-0	200-536-7
		етил нитрозоуреа	759-73-	212-

			9	072-2
Постоји егзогена метаболичка активација	HPRT	3-метилхолантрен	56-49-5	200-276-4
		N-нитрозо-диметиламин (диметил-нитрозамин)	62-75-9	200-549-8
		7,12- диметил бензантрацен	57-97-6	200-359-5
	TK (мале и велике колоније)	циклофосфамид	50-18-0	200-015-4
		циклофосфамид монохидрат	6055-19-2	
		бензо[*a*]пирен	50-32-8	200-028-5
		3-метилхолантрен	56-49-5	200-276-5
	XPRT	*N*-нитрозодиметил амин (при високим концентрацијама S-9)	62-75-9	200-549-8
		бензо[*a*]пирен	50-32-8	200-028-5

Могу да се примене и друге одговарајуће референтне супстанце као позитивне контроле, нпр. уколико лабораторија располаже базом података из ранијих студија о 5-бром 2'-дезоксиуридину (CAS бр. 59-14-3, EINECS бр. 200-415-9) тада могу да се примене ове референтне супстанце. Када су доступне класе хемикалија које су вези са позитивном контролом, разматра се њихово коришћење.

Потребно је укључити негативне контроле које се састоје само од растварача или вехикулума у подлози за третирање и са којима је поступано на исти начин као и са групама обухваћеним третманом. Користе се и нетретиране контроле, осим уколико постоје контролни подаци из претходних испитивања који доказују да одабран растварач не изазива штетне или мутагене ефекте.

1.4.3. Поступак

1.4.3.1. Третирање испитиваном супстанцом

Ћелије у пролиферацији излажу се испитиваној супстанци са и без метаболичке активације. Трајање изложености је одговарајуће (обично се постиже ефекат са три до шест сати). Време излагања може да се продужи на један или више ћелијских циклуса.

При испитивању сваке концентрације могу да се третирају једна или две културе. Када се употребљава једна култура, потребно је повећати број концентрација како би се обезбедио одговарајући број култура за анализу (нпр. најмање осам концентрација које се могу анализирати). Потребно је употребити дупликат културе негативне контроле (растварача).

Гасовоте или испарљиве супстанце испитују се применом одговарајућих метода, нпр. у затвореним посудама за културе[21, 22].

1.4.3.2. Мерење преживљавања, вијабилности и учесталости мутација

На крају експозиције ћелије се испирају и култивишу како би се одредио ниво преживљења и како би се омогућила експресија мутираног фенотипа. Мерење цитотоксичности, на основу утврђивања релативне ефикасности клонирања (преживљење) или релативног укупног раста култура, обично се почиње након третмана.

Сваком локусу је потребно одређено минимално време за скоро оптималну експресију фенотипа новоиндукованих мутација (HPRT и XPRT захтевају најмање 6-8 дана, док су TK-у потребна најмање два дана). Ћелије се узгајају у подлози са и без селективних агенаса ради утврђивања броја мутаната и ефикасности клонирања, редом. Мерење вијабилности (која се користи за израчунавање учесталости мутација) започиње на крају времена експресије засејавањем у неселективну подлогу.

Уколико испитивана супстанца приликом испитивања L5178Y $TK^{+/-}$ да позитиван резултат, колоније се разврставају по величини (измерити величину) код најмање једне од испитиваних култура (највиша позитивна концентрација) и код негативних и позитивних контрола. Уколико испитивана супстанца приликом испитивања L5178Y $TK^{+/-}$ да негативан резултат, колоније је потребно разврстати по величини код негативних и позитивних контрола. Разврставање колонија по величини може да се обави и код испитивања у којима се примењује TK6$TK^{+/-}$.

2. ПОДАЦИ

2.1. ОБРАДА РЕЗУЛТАТА

Подаци обухватају цитотоксичност и вијабилност, број колонија и учесталост мутација за третиране и контролне културе. У случају позитивне реакције у експерименту L5178Y ТК$^{+/-}$, колоније се пребројавају према критеријуму великих и малих колонија код најмање једне концентрације испитиване супстанце (највише позитивне концентрације) и код негативне и позитивне контроле. Молекуларна и цитогенетска природа великих и малих колонија мутаната детаљно је истражена[23, 24]. У експерименту ТК$^{+/-}$, колоније се пребројавају према критеријуму колонија нормалног раста (велике) и колонија успореног раста (мале)[25]. Мутиране ћелије које су претрпеле најопсежнија генетска оштећења имају продужено време удвостручавања и због тога формирају мале колоније. Опсег наведених оштећења обично се креће од губитка читавог гена до хромозомских аберација које су видљиве у кариотипу. Индукција мутаната с малим колонијама доводи се у везу са хемикалијама које узрокују велике хромозомске аберације[26]. Мутиране ћелије које су мање погођене расту брзином која је слична родитељским ћелијама и формирају велике колоније.

Наводи се и преживљавање (релативне ефикасности клонирања) или релативни укупни раст. Учесталост мутација се изражава у облику броја мутираних ћелија у односу на број преживелих ћелија.

Табеларно се наводе подаци о појединачним културама.

Не постоји потреба за верификовањем јасно позитивне реакције. Двосмислени резултати се појашњавају даљим испитивањем, тј. најбоље модификовањем експерименталних услова. Негативне резултате потребно је потврдити у зависности од случаја. У случајевима у којима се потврда негативних резултата не сматра неопходном, потребно је навести образложење. За двосмислене или негативне резултате код даљих експеримената који се надовезују на претходне потребно је размотрити модификацију параметара испитивања с циљем проширења опсега вреднованих услова. Параметри испитивања које је могуће модификовати обухватају размак између концентрација и услове метаболичке активације.

2.2. ПРОЦЕНА И ТУМАЧЕЊЕ РЕЗУЛТАТА

Постоји неколико критеријума за утврђивање позитивног резултата, као што је повећање учесталости мутација у зависности од концентрације или репродуцибилно. Првенствено је потребно узети у обзир биолошки значај резултата. Могу да се примене статистичке методе као помоћ приликом вредновања резултата испитивања. Статистички значај не треба да буде једини критеријум за позитивну реакцију.

Испитивана супстанца за коју резултати не задовољавају горе наведене критеријуме сматра се немутагеном у овом испитивању. Иако већина експеримента даје јасно позитивне или негативне резултате, у ретким случајевима утврђени подаци онемогућавају доношење коначне одлуке о деловању испитиване супстанце. Резултати могу да остану двосмислени или под знаком питања, без обзира колико се пута експеримент понови.

Позитивни резултати *in vitro* испитивања генских мутација у ћелијама сисара указују на то да испитивана супстанца узрокује генске мутације у употребљеним култивисаним ћелијама сисара. Од највећег значаја је постојање репродуцибилног позитивног одговора зависног од концентрације. Негативни резултати показују да, под експерименталним условима, испитивана супстанца не узрокује генске мутације у употребљеним култивисаним ћелијама сисара.

3. ИЗВЕШТАЈ

Извештај о испитивању садржи податке о:

1) Растварачу/вехикулуму:

– образложење избора растварача/вехикулума;

– растворљивост и стабилност испитиване супстанце у растварачу/вехикулуму, уколико су познати.

2) Ћелијама:

– врста и порекло ћелија;

– број ћелијских култура;

– број пролаза ћелија, уколико је примењиво;

– методе за одржавање ћелијске културе, уколико је примењиво;

– одсуство микоплазме.

3) Условима испитивања:

– логичка основа за избор концентрација и број култура, укључујући, податке о цитотоксичности и ограничења због растворљивости, уколико постоје;

– састав подлоге, концентрација CO_2;

– концентрација испитиване супстанце;

– запремина вехикулума и додате испитиване супстанце;

– температура инкубације;

– време инкубације;

– трајање третмана;

– густина ћелија током третмана;

– тип и састав система метаболичке активације, укључујући критеријуме прихватљивости;

– позитивне и негативне контроле;

– дужина периода експресије (укључујући број засејаних ћелија и супкултура и распоред прехрањивања, уколико одговара);

– селективни агенси;

– критеријум за сматрање испитивања позитивним, негативним или двосмисленим;

– методе примењене за пребројавање вијабилних ћелија и мутираних ћелија;

– дефиниција колонија чија се величина и врста узимају у обзир (укључујући критеријуме за „мале” и „велике” колоније, ако одговара).

4) Резултатима:

– знакови токсичности;

– знакови преципитације;

– подаци о pH и осмолалности током излагања испитиваној супстанци, уколико су утврђени;

– величина колонија уколико је иста утврђена барем за негативне и позитивне контроле;

– адекватност лабораторије да открије мутанте малих колонија применом система L5178Y $TK^{+/-}$, када је потребно;

– однос доза - одговор, где је могуће;

– статистичке анализе, уколико постоје;

– подаци негативне (растварач/вехикулум) и позитивне контроле из конкурентне студије;

– подаци негативне (растварач/вехикулум) и позитивне контроле из раније студије, са опсезима, средњом вредности и стандардном девијацијом;

– учесталост мутаната.

5) Образложењу резултата.

6) Закључцима.

4. ЛИТЕРАТУРА

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 Malling, 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, 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, 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, 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, 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, 235-239.

7. Scott, D., Galloway, S.M., Marshall, R.R., Ishidate, M., Brusick, D., Ashby, J. and Myhr, B.C. (1991). Genotoxicfity Under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9. Mutation Res., 257, 147-204.

8. Clive, D., McCuen, R., Spector, J.F.S., Piper, C. and Mavournin, K.H. (1983). Specific Gene Mutations in L5178Y Cells in Culture. A Report of the U.S. Environmental Protection Agenцy Gene-Tox Program. Mutation Res., 115, 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, 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 Performanце of the Chinese Hamster Ovary Cell/Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyl Transferase Gene Mutation Assay. Mutation Res., 189, 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, 9-17.

12. Stankowski, L.F. Jr., Tindall, K.R. and Hsie, A.W. (1986). Quantitative and Molecular Analyses of Ethyl Methanosulphonate -and ICR 191- Induced Molecular Analyses of Ethyl Methanosulphonate -and ICR 191- Induced Mutation in AS52 Cells. Mutation Res., 160, 133-147.

13. Turner, N.T., Batson, A.G. and Clive, D. (1984). Procedures for the L5178Y/TK+/- -TK+/- Mouse Lymphoma Cell Mutagenicity Assay. In: Kilbey, B.J. et al (eds.) Handbook of Mutagenicity Test Procedures, Elsevier Science Publishers, New York, pp. 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, pp. 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, 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, 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+/- Mouse Lymphoma Mutagen Assay System. Mutat. Res., 59, 61-108.

18. Maron, D.M. and Ames, B.N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutageniцity Test. Mutation Res., 113, 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* Genotoxiцity Assays. Mutagenesis, 7, 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, pp. 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, pp. 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, 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, 51-55.

24. Moore, M.M., Clive, D., Hozier, J.C., Howard, B.E., Batson, A.G., Turner, N.T. and Sawyer, J. (1985). Analysis of Trifluorothymidine-Resistant (TFTr) Mutants of L5178Y/TK+/- Mouse Lymphoma Cells. Mutation Res., 151, 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, 89-102.

26. Moore, M.M. and Doerr, C.L. (1990). Comparison of Chromosome Aberration Frequency and Small- Colony TK-Deficient Mutant Frequency in L5178Y/TK+/- -3.7.2C Mouse Lymphoma Cells. Mutagenesis, 5, 609-614.

B.18. ОШТЕЋЕЊЕ И РЕПАРАЦИЈА ДНК – ВАНРЕДНА СИНТЕЗА ДНК – ЋЕЛИЈЕ СИСАРА *IN VITRO*

1. МЕТОДА ИСПИТИВАЊА

1.1. УВОД

Видети Општи увод.

1.2. ДЕФИНИЦИЈЕ

Видети Општи увод.

1.3. РЕФЕРЕНТНЕ СУПСТАНЦЕ

Нису прописане.

1.4. ПРИНЦИП МЕТОДЕ

Испитивање ванредне синтезе ДНК (у даљем тексту: UDS) мери синтезу ДНК за репарацију након исецања и отклањања

одсечка ДНК који садржи регион оштећења који је изазван хемијским и физичким агенсима. Испитивање се заснива на уграђивању тимидина обележеног трицијумом (у даљем тексту: ^{3}H-TdR) у ДНК ћелије сисара које се не налазе у S фази ћелијског циклуса. Активно преузимање ^{3}H-TdR може да се одреди ауторадиографијом или течним сцинтилационим бројањем (у даљем тексту: LSC) ДНК из третираних ћелија. Ћелије сисара у култури, осим уколико се не користе примарни хепатоцити пацова, третирају се испитиваним агенсом са и без егзогеног система метаболичке активације. UDS може да се мери и у *in vivo* системима.

1.5. КРИТЕРИЈУМИ КВАЛИТЕТА

Нису прописани.

1.6. ОПИС МЕТОДЕ

1.6.1. Препарати

Испитиване хемикалије и контролне или референтне супстанце припремају се у подлози за раст или се растварају или суспендују у одговарајућим вехикулумима и затим се додатно разблажују у подлози за раст за употребу у експерименту. Коначна концентрација вехикулума не сме да утиче на вијабилитет ћелија.

У есеју могу да се користе примарне културе хепатоцита пацова, људских лимфоцита или утврђених ћелијских линија (нпр. људски диплоидни фибробласти).

Ћелије се излажу испитиваној хемикалији и у присуству и у одсуству одговарајућег система метаболичке активације.

1.6.2. Услови испитивања

1.6.2.1. Број култура

Потребно је најмање две културе ћелија за ауторадиографију и шест култура (или мање уколико је то научно оправдано) за одређивање LSC UDS за сваку експерименталну тачку.

1.6.2.2. Употреба негативних и позитивних контрола

У свако испитивање се укључују истовремене позитивне и негативне (нетретиране и/или вехикулум) контроле, са и без метаболичке активације.

Примери позитивних контрола за експеримент са хепатоцитима пацова обухватају 7,12-диметил бензантрацен (7,12-DMBA) или 2-ацетил аминофлуорен (2-AAF). У случају утврђених ћелијских линија, 4-нитроквинолин-N-оксид (4-NQO) представља пример позитивне контроле и за ауторадиографске и за LSC есеје који се изводе без метаболичке активације. N-диметил нитрозамин је пример једињења позитивне контроле када се користе системи метаболичке активације.

1.6.2.3. Концентрације излагања

Примењују се вишеструке концентрације испитиване супстанце у распону који одговара за дефинисање одговора. Највиша концентрација изазива одређене цитотоксичне ефекте. Једињења који су релативно нерастворна у води испитују се до границе растворљивости. У случају хемикалија које су нетоксичне и добро растворне у води, горња испитивана концентрација хемикалије утврђује се у зависности од случаја.

1.6.2.4. Ћелије

Приликом одржавања култура потребно је применити одговарајући подлогу за раст, концентрацију CO_2, температуру и влажност. Утврђене ћелијске линије периодично се проверавају на контаминацију микоплазмом.

1.6.2.5. Метаболичка активација

Систем метаболичке активације не користи се са примарним културама хепатоцита. Одређене ћелијске линије и лимфоцити излажу се испитиваној супстанци и у присуству и у одсуству одговарајућег система метаболичке активације.

1.6.3. Поступак

1.6.3.1. Припрема култура

Утврђене ћелијске линије добијају се из „stock”, култура (нпр. трипсинизацијом или отресањем), засађују се у посуде за култивисање при одговарајућој густини и инкубирају на температури од 37° C.

Краткотрајне културе хепатоцита пацова утврђују се омогућавањем свеже издвојеним хепатоцитима да се у одговарајућој подлози причврсте за површину за раст.

Културе људских лимфоцита успостављају се коришћењем одговарајућих метода.

1.6.3.2. Третирање култура испитиваном супстанцом

1.6.3.2.1. Примарни хепатоцити пацова

Свеже изоловани хепатоцити пацова третирају се испитиваном супстанцом у подлози која садржи ^{3}H-TdR током одговарајућег временског периода. На крају периода третирања, подлога се одстрањује са ћелија, које се након тога испирају, фиксирају и суше. Слајдови се затим умоче у ауторадиографску емулзију (може се користити алтернативни танки

филм), изложе, развију, обоје и преброје.

1.6.3.2.2. Утврђене ћелијске линије и лимфоцити

Ауторадиографске технике: ћелијске културе се излажу испитиваној супстанци током одговарајућих временских периода, након чега се третирају са ^{3}H-TdR. Временски периоди се одређују у складу са природом супстанце, активности метаболичких система и врстом ћелија. Како би се открио максимум UDS-а, потребно је додати ^{3}H-TdR, истовремено с испитиваном супстанцом или током неколико минута након излагања испитиваној супстанци. На избор једног од ова два поступка утичу могуће интеракције испитиване супстанце и ^{3}H-TdR. Како би се направила разлика између UDS и семи-конзервативне репликације ДНК, ова друга се може спречити, нпр. применом подлоге без аргинина, ниског садржаја серума или хидроксиуреом у подлози за култивисање.

LSC мерења UDS-а: пре третирања испитиваном супстанцом потребно је блокирати улазак ћелија у S-фазу на начин како је горе описано. Ћелије се затим излажу испитиваној хемикалији на начин како је описано за ауторадиографију. На крају периода инкубације, ДНК се екстрахује из ћелија и одређује се укупни садржај ДНК и степен инкорпорације ^{3}H-TdR.

У случајевима када се користе људски лимфоцити у горе наведеним техникама, код нестимулисаних култура није потребна супресија семи-конзервативне репликације ДНК.

1.6.3.3. Анализе

1.6.3.3.1. Ауторадиографска одређивања

Приликом одређивања UDS-а у ћелијама у култури не пребројавају се једра у S-фази. Потребно је пребројати најмање 50 ћелија по концентрацији. Слајдови се пре пребројавања шифрују. На сваком слајду се преброји неколико широко раздвојених насумичних поља. Количина инкорпорације ^{3}H-TdR у цитоплазми одређује се пребројавањем три подручја величине нуклеуса у цитоплазми сваке пребројане ћелије.

1.6.3.3.2. LSC одређивања

За LSC UDS одређивања, за сваку концентрацију, примењује се одговарајући број култура, као и за контролу.

Сви резултати се потврђују у независном експерименту.

2. ПОДАЦИ

Подаци се наводе табеларно.

2.1. АУТОРАДИОГРАФСКА ОДРЕЂИВАЊА

Степен инкорпорације ^{3}H-TdR у цитоплазми и број зрна пронађених у једру ћелије одвојено се наводе.

За описивање расподеле степена инкорпорације ^{3}H-TdR у цитоплазми и броја зрна по нуклеусу могу да се користе средње вредности, медијана и модус.

2.2. LSC ОДРЕЂИВАЊА

За одређивања која се односе на LSC, инкорпорацију ^{3}H-TdR потребно је изразити као dpm/µg ДНК. Може се применити средња вредност dpm/µg ДНК са стандардном девијацијом, а како би се описала расподела инкорпорације. Подаци се процењују одговарајућим статистичким методама.

3. ИЗВЕШТАЈ

3.1. ИЗВЕШТАЈ О ИСПИТИВАЊУ

Извештај о испитивању, уколико је могуће, садржи податке о:

– употребљеним ћелијама, густини и броју пролаза у време третирања, броју култура ћелија;

– методи примењеној у одржавању ћелијских култура, укључујући подлогу, температуру и концентрацију CO_2;

– испитиваној супстанци, вехикулуму, концентрацији и логичкој основи за избор концентрација примењених у испитивању;

– детаљима о системима метаболичке активације;

– распореду третмана;

– позитивним и негативним контролама;

– примењеној ауторадиографској техници;

– поступцима коришћеним за блокирање уласка ћелија у С-фазу;

– поступцима коришћеним за екстракцију ДНК и утврђивање укупног садржаја ДНК у LSC одређивању;

– односу доза/одговор, када је могуће;

– статистичкој процени;

– образложењу резултата;

– тумачењу резултата.

3.2. ПРОЦЕНА И ТУМАЧЕЊЕ РЕЗУЛТАТА

Видети Општи увод.

4. ЛИТЕРАТУРА

Видети Општи увод.

B.19. *IN VITRO* ИСПИТИВАЊЕ ИЗМЕНЕ СЕСТРИНСКИХ ХРОМАТИДА

1. МЕТОДА ИСПИТИВАЊА

1.1. УВОД

Видети Општи увод.

1.2. ДЕФИНИЦИЈЕ

Видети Општи увод.

1.3. РЕФЕРЕНТНЕ СУПСТАНЦЕ

Нису прописане.

1.4. ПРИНЦИП МЕТОДЕ

Испитивање измене сестринских хроматида (у даљем тексту: SCE) јесте краткотрајно испитивање намењено откривању међусобних измена ДНК две сестринске хроматиде хромозома који се удвостручава. SCE представља измену производа репликације ДНК на наизглед хомологим местима. Поступак размене вероватно обухвата прекидање и поновно сједињавање ДНК, иако се мало зна о његовој молекулској основи. Детекција SCE-а захтева улагање одређеног напора у диференцијално обележавање сестринских хроматида, што се може постићи инкорпорацијом бромдеоксиуридина (у даљем тексту: BrdU) у хромозомску ДНК кроз два ћелијска циклуса.

Ћелије сисара *in vitro* излажу се испитиваној хемикалији са и без сисарског егзогеног система метаболичке активације, уколико је сврсисходно и култивишу се током два круга репликације у медијуму који садржи BrdU. После обраде инхибитором деобног вретена (нпр. колхицином) да би се акумулирале ћелије у стадијуму митозе који је сличан метафази (с-метафаза) ћелије се скупљају и припремају се хромозомски препарати.

1.5. КРИТЕРИЈУМИ КВАЛИТЕТА

Нису прописани.

1.6. ОПИС МЕТОДЕ

1.6.1. Препарати

У испитивању могу да се користе примарне културе (људски лимфоцити) или одређене ћелијске линије (нпр. ћелије оваријума кинеског хрчка). Ћелијске линије се проверавају на контаминацију микоплазмом,

Неопходно је да се примени одговарајући медијум за културе и услови инкубације (нпр. температура, посуде за културе, концентрација CO_2 и влажност).

Испитиване супстанце могу да се припреме у медијуму културе или да се растворе или суспендују у одговарајућим вехикулумима пре третирања ћелија. Коначна концентрација вехикулума у систему културе не сме у знатној мери да утиче на вијабилитет ћелија или степен раста. Утицај на учесталост SCE-а се прати путем контроле растварача.

Ћелије се излажу испитиваној супстанци у присуству и у одсуству сисарског егзогеног система метаболичке активације. Алтернативно, у случајевима када се користе типови ћелија с интринзичном метаболичком активношћу, обим и природа активности одговарају класи хемикалије која се испитује.

1.6.2. Услови испитивања

1.6.2.1. Број култура

За сваку тачку испитивања примењује се најмање две културе.

1.6.2.2. Примена позитивних и негативних контрола

У сваки експеримент се укључују позитивне контроле и то применом једињења директног дејства, као и једињења које захтева метаболичку активацију. Потребна је и примена контроле вехикулума.

Супстанце које се могу применити као позитивне контроле:

– једињење директног деловања;

– етил-метансулфонат;

– једињење индиректног деловања;

– циклофосфамид.

Када је примерено, у испитивање може да се укључи додатна позитивна контрола исте хемијске класе којој припада и хемикалија која се испитује.

1.6.2.3. Концентрације излагања

Потребно је да се примени најмање три одговарајуће распоређене концентрације испитиване супстанце. Највиша концентрација изазива значајан токсични ефект, али при томе омогућава одговарајућу репликацију ћелија. Супстанце које су релативно нерастворљиве у води испитују се до границе растворљивости уз примену одговарајућих поступака. У случају супстанци које су слободно растворљиве у води и нису токсичне, горња концентрација испитиване супстанце утврђује се од случаја до случаја.

1.6.3. Поступак

1.6.3.1. Припрема култура

Утврђене ћелијске линије добијају се из постојећих („stock”) култура (нпр. трипсинизацијом или отресањем), засејавају се у посуде за културе на одговарајућој густини и инкубирају на температури од 37° C. За једнослојне културе потребно је прилагодити број ћелија по посуди, тако да културе у време скупљања не буду конфлуентне много више од 50%. Алтернативно, могу да се примене ћелије у култури у облику суспензије. Културе људских лимфоцита добијају се из хепаринизиране крви одговарајућим техникама и инкубирају се на температури од 37° C.

1.6.3.2. Третирање

Ћелије које се налазе у експоненцијалном стадијуму раста излажу се испитиваној супстанци у одговарајућем временском периоду. У већини случајева један до два сата може да буде делотворно, али је у одређеним ситуацијама могуће продужити време третирања до два цела ћелијска циклуса. Ћелије без довољне интринзичне (сопствене) метаболичке активности излажу се испитиваној хемикалији у присуству и одсуству одговарајућег система метаболичке активације. По завршетку периода излагања са ћелија се испирају остаци испитиване супстанце па се исте култивишу током два круга репликације у присуству BrdU. Као алтернатива може се применити поступак током ког се ћелије истовремено излажу испитиваној хемикалији и BrdU током читавог времена култивисања од два ћелијска циклуса.

Културе људских лимфоцита третирају се док се налазе у полусинхроном стању.

Анализа ћелија обавља се током њихове друге деобе после третмана, како би се обезбедило да најосетљивији стадијуми ћелијског циклуса буду изложени хемикалији. Са свим културама којима се додаје BrdU рукује се у мраку или уз пригушену светлост инкандесцентних лампи, све до скупљања ћелија, како би се фотолиза ДНК који садржи BrdU свела на најмању меру.

1.6.3.3. Скупљање ћелија

Ћелијске културе третирају се инхибитором деобног вретена (нпр. колхицином) један до четири сата пре скупљања. Ћелије сваке културе убирају се и обрађују одвојено за препарате хромозома.

1.6.3.4. Препарати и бојење хромозома

Хромозомски препарати припремају се применом стандардних цитогенетских техника. Бојење слајдова, како би се приказали SCE, може да се изведе помоћу неколико техника (нпр. флуоресценција плус Giemsa метода).

1.6.4. Анализа

Број анализираних ћелија заснива се на спонтаној контролној учесталости SCE. Обично се за SCE анализира најмање 25 добро распрострањених метафаза по култури. Слајдови се пре анализе шифрирају. Код људских лимфоцита анализирају се само метафазе које садрже 46 центромера. Код утврђених ћелијских линија анализирају се само метафазе које садрже ± 2 центромере модалног броја. Наводи се да ли се центромерна замена ознаке вреднује као SCE. Резултати се потврђују у независном испитивању.

2. ПОДАЦИ

Подаци се наводе табеларно. Број SCE за сваку метафазу и број SCE по хромозому за сваку метафазу наводе се одвојено за све третиране и контролне културе.

Подаци се процењују коришћењем одговарајућих статистичких метода.

3. ИЗВЕШТАЈ

3.1. ИЗВЕШТАЈ О ИСПИТИВАЊУ

Извештај о испитивању, уколико је могуће, садржи податке о:

– употребљеним ћелијама, методама одржавања ћелијске културе;

– условима испитивања: састав медијума, концентрација CO_2, концентрација испитиване супстанце, коришћени вехикулум, температура инкубације, време третирања, коришћени инхибитор деобног вретена, његова концентрација и трајање третмана истим, врста коришћеног сисарског система активације, позитивне и негативне контроле;

– броју ћелијских култура по тачки испитивања;

– детаљима технике коришћене за припрему слајдова;

– броју анализираних метафаза (подаци се наводе одвојено за сваку културу);

– просечном броју SCE по ћелији и по хромозому (подаци се наводе одвојено за сваку културу);

– критеријумима за вредновање SCE;

– логичкој основи за избор дозе;

– односу доза/одговор, ако је примењиво;

– статистичкој процени;

– образложењу резултата;

– тумачењу резултата.

3.2. ПРОЦЕНА И ТУМАЧЕЊЕ РЕЗУЛТАТА

Видети Општи увод.

4. ЛИТЕРАТУРА

Видети Општи увод.

B.20. ИСПИТИВАЊЕ РЕЦЕСИВНЕ ЛЕТАЛНОСТИ ВЕЗАНЕ ЗА ПОЛ НА DROSOPHILA-e MELANOGASTER

1. МЕТОДА ИСПИТИВАЊА

1.1. УВОД

Видети Општи увод.

1.2. ДЕФИНИЦИЈЕ

Видети Општи увод.

1.3. РЕФЕРЕНТНЕ СУПСТАНЦЕ

Нису прописане.

1.4. ПРИНЦИП МЕТОДЕ

Испитивањем рецесивне леталности везане за пол (у даљем тексту: SLRL) код Drosophila-e melanogaster открива се појава мутација, укључујући и тачкасте мутације и мале делеције, у заметној лози инсекта. Наведено испитивање је анализа напредне мутације, која је способна за скрининг мутација на око 800 локуса (генских места) на хромозому X; што чини око 80% свих локуса хромозома X. Хромозом X представља приближно једну петину читавог хаплоидног генома.

Мутације у хромозому X Drosophila-e melanogaster фенотипски су изражене код мужјака који носе мутирани ген. Кад је мутација летална у хемизиготним условима, о њеном постојању се закључује на основу изостанка једне категорије мушких потомака од две категорије које нормално изнесе хетерозиготна женка. SLRL испитивање користи наведене чињенице помоћу посебно означених и распоређених хромозома.

1.5. КРИТЕРИЈУМИ КВАЛИТЕТА

Нису прописани.

1.6. ОПИС МЕТОДЕ

1.6.1. Припреме

1.6.1.1. Културе соја

Могу се применити мужјаци квалитетно дефинисане културе соја дивљег типа и женки културе соја Myller-5. Могу се употребити и остале, добро означене, женске културе соја с вишеструким инвертираним хромозомима X.

1.6.1.2. Испитивана супстанца

Испитиване супстанце се растварају у води. Супстанце које су нерастворљиве у води могу да се растворе или суспендују у одговарајућем вехикулуму (нпр. смеши етанола и Tween-а 60 или 80), а затим пре примене да се разблаже у води или раствору соли. Диметилсулфоксид (у даљем тексту: ДМСО) се избегава као медијум.

1.6.1.3. Број животиња

Испитивање је осмишљено тако да има унапред одређену осетљивост и снагу. Учесталост спонтаних мутација, која буде примећена у одговарајућем контролном узорку, у значајној мери утиче на број третираних хромозома који се анализирају.

1.6.1.4. Пут примене

Излагање може бити: оралним путем, путем ињекције или излагање гасовима или парама. Испитивана супстанца може се дати и у раствору шећера. Када је неопходно, материја може да се раствори у 0,7% раствору NaCl и да се убризга у грудни кош или абдомен.

1.6.1.5. Примена позитивних и негативних контрола

Неопходно је укључити негативне (вехикулум) и позитивне контроле. Уколико постоје одговарајући лабораторијски подаци из претходних испитивања, нису потребне истовремене контроле.

1.6.1.6. Нивои излагања

Примењују се три нивоа излагања. За прелиминарну процену може да се примени један ниво излагања испитиваној супстанци, с тим да наведени ниво излагања треба да буде или максимална толерисана концентрација или она концентрација при којој настају неки знаци токсичности. За нетоксичне материје потребно је излагање максимално могућој концентрацији.

1.6.2. Поступак

Мужјаци дивљег типа (стари три до пет дана) третирају се испитиваном супстанцом и појединачно паре с великим бројем невиних женки културе соја Myller-5 или друге културе соја, означеним (вишеструким инвертираним хромозомима X) на одговарајући начин. Женке се замењују новим невиним женкама свака два до три дана како би се обухватио читав циклус полне ћелије. Потомци наведених женки проверавају се на постојање леталних ефекта који одговарају ефектима на зрелом сперматозоиду, сперматидима у средњој или касној фази, сперматидима у раној фази, сперматоцитима и сперматогонијима у време третирања испитиваном супстанцом.

Хетерозиготним F_1 женкама, добијенима наведеним укрштањем, допуштено је да се појединачно паре (тј. једна женка по бочици) са својом браћом. У F_2 генерацији свака се култура проверава на одсуство мужјака дивљег типа. Уколико се догоди да култура потиче од F_1 женке која је носилац смртности у родитељском хромозому X (тј. није примећен ниједан мужјак с третираним хромозомом), кћери женке с истим генотипом обавезно се испитују како би се утврдило да ли се смртност понавља у наредној генерацији.

2. ПОДАЦИ

Подаци се наводе у таблеарном облику како би се приказао број испитаних хромозома X, број неплодних мужјака и број леталних хромозома при свакој концентрацији излагања и за сваки период парења за сваког третираног мужјака. Неопходно је навести и бројеве група (кластера) различитих величина по сваком мужјаку. Потребно је да се добијени резултати потврде у посебном испитивању.

Приликом процене испитивања рецесивне леталности везане за пол примењују се одговарајуће статистичке методе. Груписање рецесивних смртних исхода који потичу од једнога мужјака разматра се и процењује одговарајућом статистичком методом.

3. ИЗВЕШТАЈ

3.1. ИЗВЕШТАЈ О ИСПИТИВАЊУ

Извештај о испитивању, уколико је могуће, садржи податке о:

– култури соја: коришћене културе соја или сојеви Drosophila-е, старост инсеката, број третираних мужјака, број стерилних мужјака, број утврђенихF2култура, бројF2култура без потомства, број хромозома носилаца летала који су примећени при свакоме стадијуму полне ћелије;

– критеријумима за утврђивање величине третираних група;

– условима испитивања, детаљан опис плана третирања и узорковања, нивое излагања, податке о токсичности, негативне (растварач) и позитивне контроле, зависно од конкретног случаја;

– критеријумима за бележење леталних мутација;

– односу изложеност/ефекат, где је могуће;

– процени података;

– образложењу резултата;

– тумачењу резултата.

3.2. ПРОЦЕНА И ТУМАЧЕЊЕ РЕЗУЛТАТА

Видети Општи увод.

4. ЛИТЕРАТУРА

Видети Општи увод.

B.21. *IN VITRO* ИСПИТИВАЊА ТРАНСФОРМАЦИЈЕ ЋЕЛИЈА СИСАРА

1. МЕТОДА ИСПИТИВАЊА

1.1. УВОД

Видети Општи увод.

1.2. ДЕФИНИЦИЈЕ

Видети Општи увод.

1.3. РЕФЕРЕНТНЕ СУПСТАНЦЕ

Нису прописане.

1.4. ПРИНЦИП МЕТОДЕ

Културе ћелија сисара могу да се користе за откривање фенотипских промена *in vitro* изазваних хемијским супстанцама које су повезане с малигном трансформацијом *in vivo*. Међу ћелије које се највише примењују спадају: C3H10T$_{1/2}$, 3T3, SHE и ћелије пацова Fischer соја, док се испитивања ослањају на промене у морфологији ћелије, формирању фокуса или промене у зависности од причвршћивања у получврстом агару. Постоје и културе ћелија које се ређе користе, а које откривају друге физиолошке или морфолошке промене у ћелијама после излагања карциногеним хемикалијама. Ниједна од *in vitro* крајњих тачака испитивања нема утврђену механистичку везу с раком. Неке од култура ћелија могу да детектују промоторе тумора. Цитотоксичност може да се утврди мерењем ефекта испитиваног материјала на способности формирања колонија (ефикасност клонирања) или степене раста култура. Мерење цитотоксичности служи да се утврди да је излагање испитиваној хемикалији било токсиколошки релевантно, али не може да се употреби за израчунавање трансформације: учесталости код свих анализа с обзиром да неке од њих могу да укључују продужену инкубацију и/или субкултивисање.

1.5. КРИТЕРИЈУМИ КВАЛИТЕТА

Нису прописани.

1.6. ОПИС МЕТОДЕ

1.6.1. Припреме

1.6.1.1. Ћелије

У зависности од врсте испитивања трансформације која се користи, доступне су различите ћелијске линије или примарне ћелије. Испитивач се стара да се код ћелија које се користе у испитивању после излагања познатим карциногенима покаже одговарајућа промена у фенотипу, као и да се побрине за то да је испитивање, у лабораторији испитивача, доказаног и документованог квалитета и поузданости.

1.6.1.2. Медијум

Неопходно је да се користи медијум и експериментални услови који одговарају облику испитивања трансформације који се користи.

1.6.1.3. Испитивана супстанца

Испитиване супстанце могу да се припреме у медијуму културе или да се растворе или суспендују у одговарајућим вехикулумима пре третирања ћелија. Коначна концентрација вехикулума у систему културе не сме да утиче на вијабилитет ћелија, степен раста или учесталост трансформација.

1.6.1.4. Метаболичка активација

Ћелије се излажу испитиваној супстанци у присуству и у одсуству одговарајућег система метаболичке активације. Алтернативно, када се користе типови ћелија са интринзичном (сопственом) метаболичком активношћу, природа активности одговара категорији (класи) хемикалије која се испитује.

1.6.2. Услови испитивања

1.6.2.1. Примена позитивних и негативних контрола

У свако испитивање се укључују позитивне контроле и то применом једињења директног деловања, као и једињења које захтева метаболичку активацију. Неопходно је применити и негативне контроле (вехикулума).

Супстанце које се могу применити као позитивне контроле су:

а) Хемикалије директног деловања:

– етил метансулфонат;

– b пропиолактон.

б) Једињења који захтевају метаболичку активацију:

– 2- ацетил аминофлуорен;

– 4-диметиламиноазобензе;,

– 7,12-диметилбенз[а]антрацен.

Кад је примерено, у испитивање се укључује додатна позитивна контрола исте хемијске категорије којој припада и једињење који се испитује.

1.6.2.2. Концентрације излагања

Неопходно је да се примени неколико концентрација испитиване супстанце. Наведене концентрације треба да изазову токсичне ефекте зависне од концентрације, при чему највиша концентрација узрокује низак степен преживљења, док је преживљење код најниже концентрације слично ономе код негативне контроле. Супстанце које су релативно нерастворљиве у води испитују се до границе растворљивости, уз примену одговарајућих поступака. У случају супстанци које су нетоксичне и добро растворљиве у води, горња концентрација испитиване супстанце утврђује се посебно за сваки појединачни случај.

1.6.3. Поступак

Ћелије се излажу испитиваној супстанци током одговарајућег временског периода, у зависности од система који се користи у испитивању. У случају продуженог излагања, може се укључити поновљено дозирање праћено променом медијума (и уколико је потребно, свежом смешом за метаболичку активацију). Ћелије без довољне интринзичне (сопствене) метаболичке активности излажу се испитиваној супстанци у присуству и одсуству одговарајућег система метаболичке активације. По завршетку периода излагања са ћелија се испирају остаци испитиване супстанце и исте ћелије се култивишу под условима који су примерени за појаву трансформисаног фенотипа који се посматра, а после чега се утврђује инциденца трансформације. Сви резултати потврђују се у оквиру независног испитивања.

2. ПОДАЦИ

Подаци се наводе табеларно и могу бити различито формулисани зависно од облика испитивања који се користи, на пример: број подлога, позитивне подлоге или број трансформисаних ћелија. Кад одговара, степен преживљавања се изражава у облику процента од контролних нивоа. Учесталост трансформација изражава се као број трансформаната према броју преживелих. Подаци се процењују применом одговарајућих статистичких метода.

3. ИЗВЕШТАЈ

3.1. ИЗВЕШТАЈ О ИСПИТИВАЊУ

Извештај о испитивању, уколико је могуће, садржи податке о:

– коришћеном типу ћелија, броју ћелијских култура, методама одржавања ћелијских култура;

– условима испитивања: концентрација испитиване супстанце, коришћени медијум, време инкубације, трајање и учесталост третирања, густина ћелија током третмана, врста коришћеног егзогеног система метаболичке активације, позитивне и негативне контроле, детаљан опис фенотипа који се посматра, коришћени селективни систем (зависно од случаја), логичка основа за избор дозе;

– методи коришћеној за пребројавање вијабилних и трансформисаних ћелија;

– статистичкој процени;

– образложењу резултата;

– тумачењу резултата.

3.2. ПРОЦЕНА И ТУМАЧЕЊЕ РЕЗУЛТАТА

Видети Општи увод.

4. ЛИТЕРАТУРА

Видети Општи увод.

B.22. ИСПИТИВАЊЕ ДОМИНАНТНЕ ЛЕТАЛНОСТИ НА ГЛОДАРИМА

1. МЕТОДА ИСПИТИВАЊА

1.1. УВОД

Видети Општи увод.

1.2. ДЕФИНИЦИЈЕ

Видети Општи увод.

1.3. РЕФЕРЕНТНЕ СУПСТАНЦЕ

Нису прописане.

1.4. ПРИНЦИП МЕТОДЕ

Ефекти доминантне леталности за последицу имају ембрионалну или феталну смрт. Индукција доминантних летала излагањем хемијској супстанци указује на чињеницу да је супстанца деловала на герминативно ткиво испитиване животињске врсте. Општеприхваћено мишљење је да су доминантни летали последица хромозомских оштећења (структурних и нумеричких аномалија). У случају третирања женки испитиваном супстанцом, ембрионална смрт може да буде и последица токсичних дејстава.

Обично се мужјаци излажу деловању испитиваног једињења и потом се паре с нетретираним невиним женкама. Применом секвенцијалних интервала парења могуће је одвојено испитати различите стадијуме полних ћелија. Повећање броја мртвих импланта по свакој женки у третираној групи у односу на број мртвих импланта по свакој женки у контролној групи одражава постимплантациони губитак. Предимплантациони губитак може да се процени на основу броја жутих тела или поређењем укупнога броја импланта по свакој женки у контролној и третираној групи. Укупан ефект доминантне леталности представља збир пред- и пост-имплантационог губитка. Процена укупнога ефекта доминантне леталности заснива се на поређењу живих импланта по свакој женки у испитиваној групи и живих импланта по свакој женки у контролној групи. Смањење броја импланта у одређеним временским размацима може бити последица убијања ћелија (тј. сперматоцита и/или сперматогонија).

1.5. КРИТЕРИЈУМИ КВАЛИТЕТА

Нису прописани.

1.6. ОПИС МЕТОДЕ

1.6.1. Припреме

Када је могуће, испитиване супстанце се растварају или суспендују у изотоничном раствору. Хемикалије нерастворљиве у води могу да се растворе или суспендују у одговарајућим медијумима. Медијум који се користи не сме да интерферира са испитиваном хемикалијом, нити за последицу да има токсичне ефекте. Неопходна је употреба свежих раствора/суспензија испитиване хемикалије.

1.6.2. Услови испитивања

1.6.2.1. Пут примене

Испитивано једињење углавном се примењује само једном. На основу токсиколошких података може се применити план поновљеног третирања. Уобичајени путеви примене су орална интубација или интраперитонеална ињекција. Могу да одговарају и други путеви примене.

1.6.2.2. Експериментални животиње

Као одговарајуће врсте за испитивање препоручују се пацови и мишеви. Здраве и потпуно полно зреле животиње насумично се бирају и додељују групама које се третирају и контролним групама.

1.6.2.3. Број и пол

Користи се одговарајући број третираних мужјака, узимајући у обзир спонтано варирање биолошких својстава која се вреднују. Изабрани број се заснива на унапред одређеној осетљивости детекције и степена значаја. На пример, у типичном испитивању, број мужјака у свакој групи која прима одређену дозу је довољан да се обезбеди између 30 и 50 гравидних женки по сваком интервалу парења.

1.6.2.4. Примена позитивних и негативних контрола

У сваки експеримент се укључују истовремене позитивне и негативне (медијум) контроле. Кад постоје прихватљиви резултати позитивне контроле из експеримената који су недавно обављени у истој лабораторији, они се могу користити уместо истовремене позитивне контроле. Супстанце позитивне контроле користе се у прикладној ниској дози (нпр. MMS, интраперитонеално при 10 mg/kg), а како би се показала осетљивост испитивања.

1.6.2.5. Дозни нивои

Обично се користе три нивоа доза. Висока доза проузрокује знакове токсичности или смањене плодности третираних животиња. У одређеним случајевима једна висока доза може да буде довољна.

1.6.2.6. Испитивање граничне дозе

Нетоксичне супстанце траба испитати при дози од 5 g/kg у облику једне дозе, или при дози од 1 g/kg/дневно приликом поновљеног дозирања.

1.6.3. Поступак

Постоји неколико планова за извођење поступка. Највише се примењује дозирање испитиване супстанце у облику једнократне примене. Могу се применити и други планови третирања.

Поједини мужјаци се секвенцијално паре с једном или две нетретиране невине женке у одговарајућим временским интервалима после третирања испитиваном супстанцом. Женке је потребно оставити заједно с мужјацима током најмање

једног еструсног циклуса или док не дође до парења које се утврђује према присутности сперме у вагини или према постојању вагиналног „чепа”.

Број парења после третирања руководи се планом третирања и обезбеђује узорковање свих стадијума полних ћелије после третирања.

Женке се лишавају живота на хуман начин у другој половини гравидитета и прегледа се садржај материце како би се утврдио број живих и мртвих импланта. Могу се прегледати и јајници како би се утврдио број жутих тела.

2. ПОДАЦИ

Подаци се наводе табеларно како би се приказао број мужјака, број гравидних женки и број негравидних женки. Резултати свакога парења, укључујући идентитет сваког мужјака и женке, наводе се појединачно. Потребно је забележити недељу парења за сваку женку, величину дозе коју су примили мужјаци, као и учесталости појаве живих и мртвих импланта.

Израчунавање укупног ефекта доминантне леталности заснива се на поређењу живих импланта по свакој женки у испитиваној групи са живим имплантима по свакој женки у контролној групи. Однос мртвих и живих импланта из третиране групе у поређењу са односом у контролној групи анализира се како би се показао постимплантациони губитак.

Уколико се подаци наводе у облику раних и касних смрти, у табелама се то јасно назначава. Наводи се и предимплантациони губитак, уколико је процењен. Предимплантациони губитак може се израчунати као разлика између броја жутих тела и броја импланта или као смањење просечног броја импланта по материци, а у поређењу са контролним парењима.

Подаци се процењују применом одговарајућих статистичких метода.

3. ИЗВЕШТАЈ

3.1. ИЗВЕШТАЈ О ИСПИТИВАЊУ

Извештај о испитивању, уколико је могуће, садржи податке о:

– животињској врсти, соју, старости и телесној маси коришћених животиња, броју животиња свакога пола у експерименталним и контролним групама;

– испитиваној супстанци, медијуму, испитаним нивоима доза и логичкој основи за избор доза, негативној и позитивној контроли, токсичности;

– путу и плану примене;

– распореду парења;

– методама које су коришћене да би се утврдило да је дошло до парења;

– времену лишавања живота на хуман начин;

– критеријумима бележења доминантних летала;

– односу доза/ефекат, ако је применљиво;

– статистичкој процени;

– образложењу резултата;

– тумачењу резултата.

3.2. ПРОЦЕНА И ТУМАЧЕЊЕ РЕЗУЛТАТА

Видети Општи увод.

4. ЛИТЕРАТУРА

Видети Општи увод.

B.23. ИСПИТИВАЊЕ ХРОМОЗОМСКИХ АБЕРАЦИЈА НА СПЕРМАТОГОНИЈИМА СИСАРА

1. МЕТОДА ИСПИТИВАЊА

Метода се заснива на Упутству за испитивање OECD 483, Mammalian Spermatogonial Chromosome Aberration Test (1997).

1.1. УВОД

Сврха испитивања хромозомских аберација у сперматогонијима сисара *in vivo* јесте идентификација супстанци које узрокују структуралне хромозомске аберације у ћелијама сперматогонија сисара[1, 2, 3, 4, 5]. Структуралне аберације могу бити двојаке: хромозомског или хроматидног типа. Већина хемијских мутагена узрокује аберације хроматидног типа, али понекад се појављују и аберације хромозомског типа. Ова метода није намењена мерењу нумеричких аберација и обично се не употребљава у ту сврху. Хромозомске мутације и са њима повезане појаве узрок су мноштва генетских обољења код људи.

Ово испитивање мери хромозомске појаве у заметним ћелијама сперматогонија и од њега се очекује да буде успешно у предвиђању индуковања наследних мутација у полним ћелијама.

У овом испитивању обично се употребљавају глодари. Наведено цитогенетско испитивање *in vivo* открива хромозомске аберације приликом митозе сперматогонија. Остале циљне ћелије нису предмет ове методе.

Да би се откриле аберације хроматидног типа у ћелијама сперматогонија потребно је испитати прву митотску деобу ћелија после третмана, а пре него што наведене лезије нестану у наредним ћелијским деобама. Додатни подаци о третираним матичним ћелијама сперматогонија могу се добити анализом аберација хромозомскога типа код мејотских хромозома приликом дијакинезе-метафазе 1 када третиране ћелије постају сперматоцити.

Сврха овога испитивања *in vivo* јесте испитати да ли су мутагени соматских ћелија активни и у полним ћелијама. Уз то, ово испитивање на сперматогонијима одговара и за оцењивање мутагености, због тога што омогућава узимање у обзир фактор метаболизма *in vivo*, фармакокинетике и процеса поправка ДНК.

У тестису се налазе бројне генерације сперматогонија које имају различите нивое осетљивости на хемијски третман. Откривене аберације представљају збирну реакцију третираних ћелијских популација сперматогонија, при чему преовлађују диференциране ћелије сперматогонија које су бројније. Због физичке и физиолошке баријере Сертолијевих ћелија и баријере између крви и тестиса, различите генерације сперматогонија могу или не морају бити изложене крвотоку, зависно од њиховог положаја у тестисима.

Овај облик испитивања не одговара уколико се појаве докази да испитивана супстанца или реактивни метаболит неће доспети до циљног ткива.

Видети Општи увод.

1.2. ДЕФИНИЦИЈЕ

Аберација хроматидног типа јесте структурално оштећење хромозома које се изражава као цепање појединих хроматида или цепање и поновно сједињавање између хроматида.

Аберација хромозомског типа јесте структурно оштећење хромозома које се изражава као цепање или цепање и поновно сједињавање обе хроматиде на идентичном месту.

Хромозомски прекид јесте ахроматска лезија мања од ширине једне хроматиде с минимумом непоравнатошћу хроматида.

Нумеричка аберација јесте промена у броју хромозома која одступа од редовног броја карактеристичног за животиње које се користе.

Полиплоидност јесте умножак хаплоидног броја хромозома (*n*) различит од диплоидног броја (тј. 3*n*, 4*n*, итд).

Структурна аберација јесте промена у структури хромозома која се може открити микроскопским прегледом метафазног стадијума деобе ћелија, а која се запажа у облику делеција, транспозиција или реципрочних транслокација.

1.3. ПРИНЦИП МЕТОДЕ

Животиње се одговарајућим путем експозиције излажу испитиваној супстанци и лишавају живота у одговарајуће време после третирања. Пре лишавања живота на хуман начин, животиње се третирају супстанцом за заустављање метафазе (нпр. колхицином или Colcemid-om®). После тога, припреме се и обоје хромозомски препарати од полних ћелија и анализирају ћелије у метафази с циљем утврђивања хромозомских аберација.

1.4. ОПИС МЕТОДЕ

1.4.1. Припреме

1.4.1.1. Избор животињске врсте

Обично се користе кинески хрчци и мишеви мушкога пола. Могу се применити и мужјаци друге одговарајуће врсте сисара. Користе се лабораторијски сојеви младих здравих одраслих животиња који се обично користе. На почетку истраживања одступање у телесној маси животиња треба да буде минимално и да не премашује ± 20% просечне телесне масе.

1.4.1.2. Услови смештаја и исхране

Примењују се општи услови који су наведени у Општем уводу, иако се влажност одржава на нивоу од 50% до 60%.

1.4.1.3. Припрема животиња

Здрави одрасли мужјаци се, по методи случајног избора, сврставају у контролне и експерименталне групе. Кавези су распоређени на начин којим ће ефекти који су последица положаја кавеза бити сведени на најмању могућу меру. Животиње се означавају на јединствен начин. Животиње се аклиматизују на лабораторијске услове најмање пет дана пре почетка испитивања.

1.4.1.4. Припрема доза

Чврсте испитиване супстанце растварају се или суспендују у одговарајућим растварачима или вехикулумима и, уколико је потребно, разређују пре дозирања животиња. Течне испитиване супстанце могу директно да се дозирају или разреде пре

дозирања. Користе се свеже припремљени препарати испитиване супстанце, осим ако подаци о стабилности указују да је чување прихватљиво.

1.4.2. Услови испитивања

1.4.2.1. Растварач/вехикулум

Растварач/вехикулум не сме да има токсичне ефекте при нивоу доза које се примењују и не сме да постоји сумња да ће хемијски да реагује са испитиваном супстанцом. Уколико се примењују мање познати растварачи/вехикулуми, њихово укључивање у испитивање се оправдава подацима о њиховој компатибилности. Кад год је могуће, препоручује се да се прво размотри примена воденог растварача/вехикулума.

1.4.2.2. Контроле

Истовремене позитивне и негативне (растварач/вехикулум) контроле укључују се у свако испитивање. Осим третирања испитиваном супстанцом, са животињама у контролним групама се поступа на исти начин као са животињама у третираним групама.

Позитивне контроле изазивају структурне хромозомске аберације у ћелијама сперматогонија *in vivo* при истим нивоима изложености за које се очекује да ће изазвати приметно повећање у односу на подлогу.

Позитивне контролне дозе се бирају тако да ефекти буду јасни, али да лицу које чита експеримент одмах не открију идентитет шифрираних микроскопских препарата (слајдова). Прихватљиво је да се позитивне контроле примене путем који је различит од онога код испитиване супстанце и да се узорак узме само једном. Када је могуће узима се у обзир примена хемикалија позитивне контроле које припадају истој хемијској категорији као и испитивана хемикалија. Примери супстанци позитивне контроле:

Табела 1.

Супстанца	CAS бр.	EINECS бр.
циклофосфамид циклофосфамид монохидрат	50-18-0 6055-19-2	200-015-4
циклохексиламин	108-91-8	203-629-0
митомицин *C*	50-07-7	200-008-6
мономерни акриламид	79-06-1	201-173-7
триетиленмеламин	51-18-3	200-083-5

Негативне контроле, третиране само растварачем или вехикулумом, иначе третиране на исти начин као групе обухваћене третманом, укључују се у свако време узорковања, осим уколико се, из прошлих контролних података, могу екстраполирати прихватљиве међу-животињске варијабилности и фреквентност ћелија с хромозомским аберацијама. Истовремено се користе и нетретиране контроле, осим уколико постоје контролни подаци из прошлих испитивања или објављени контролни подаци који доказују да одабран растварач/вехикулум не изазива штетне или мутагене ефекте.

1.5. ПОСТУПАК

1.5.1. Број животиња

Свака третирана и контролна група обухвата најмање пет мужјака на којима се може обавити анализа.

1.5.2. План третмана

Испитиване супстанце је најбоље давати једном или двапут (тј. у оквиру једног или два третмана). Испитиване супстанце могу да се дају у облику подељене дозе, тј. у облику два третмана током истога дана у размаку од највише неколико сати, а како би се олакшало давање велике количине материјала. Остали режими дозирања научно се оправдавају.

У највишој дозној групи узорковање се врши два пута после третирања. С обзиром да испитивана супстанце може да утиче на динамику ћелијскога циклуса, једно узорковање се обавља раније, око 24 сата после третмана, а друго касније, око 48 сати после третмана. Код осталих доза, различитих од највише дозе, узорке је потребно узети 24 сата или 1,5 дужину ћелијског циклуса после третмана, осим уколико је познато да би друго време узорковања било прикладније за откривање ефеката[6].

Додатни узорци могу да се узимају и у друго време, нпр. у случају хемикалија које могу да доведу до заостајање хромозома или ефекте независне од S-фазе, примеренije је да се узорковање обави раније[1].

Примереност плана поновљеног третирања утврђује се од случаја до случаја. После програма поновљеног третирања, животиње се лишавају живота на хуман начин 24 сата (1,5 дужина ћелијског циклуса) после последњег уноса испитиване супстанце. Кад је потребно, могу се узети и додатни узорци у друго време.

Пре лишавања живота на хуман начин животињама се интраперитонеално инјектује одговарајућа доза супстанце за заустављање метафазе (нпр. Colcemid-a® или колхицина). Затим се узимају животињски узорци у одговарајућим интервалима.

За мишеве овај интервал износи око 3 до 5 сати; за кинеске хрчке интервал износи око 4 до 5 сати.

1.5.3. Дозни нивои

Уколико се истраживање обавља са циљем утврђивања распона због тога што не постоје одговарајући подаци, наведено истраживање се обавља у истој лабораторији, уз коришћење исте врсте, соја, пола и режима третирања који ће бити примењени у главном истраживању[7]. Уколико постоји токсичност, приликом првог интервала узорковања користе се три нивоа дозирања. Ови нивои дозирања обухватају распон од максималне до минималне токсичности или без токсичности. Приликом каснијег интервала узорковања потребно је употребити само највишу дозу. Највиша доза се дефинише као доза услед које настају симптоми токсичности такве природе да се очекује да би већи нивои дозирања, засновани на истом режиму дозирања, изазвали смрт.

Супстанце специфичног биолошког деловања у малим нетоксичним дозама (као што су хормони и митогена) изузетак су од критеријума за постављање доза, па се вреднују од случаја до случаја. Највиша доза се може дефинисати и као доза која доводи до неких индикација токсичности у ћелијама сперматогонија (нпр. смањење односа између митоза сперматогонија у првој и другој мејотској метафази; наведено смањење не сме да буде веће од 50%).

1.5.4. Испитивање граничне дозе

Уколико приликом испитивања једном дозом, на нивоу од најмање 2.000 mg/kg ТМ/дневно у оквиру једног третмана или два третмана током истога дана, не настану никакви приметни токсични ефекти и уколико се генотоксичност не очекује на основу података о структурно сличним супстанцама, није неопходно целокупно испитивање које примењује три нивоа дозирања. Очекивана изложеност људи може указати на потребу за применом веће дозе током испитивања граничне дозе.

1.5.5. Примена доза

Испитивана супстанца обично се примењује интубацијом (присилно храњење), и то коришћењем желудачне цеви или одговарајуће интубацијске каниле или интраперитонеалном инјекцијом. Остали путеви излагања могу да буду прихватљиви у случајевима у којима се могу оправдати. Максимална запремина течности која може да се да одједном путем цеви или инјекцијом зависи од величине експерименталне животиње. Запремина не сме да пређе 2 ml/100 g ТМ. Употребу већих запремина потребно је оправдати. Изузев у случају иритабилних и корозивних супстанци које нормално показују погоршане ефекте при вишим концентрацијама, варијабилност екперименталне запремине своди се на најмању могућу меру прилагођавањем концентрације, а како би се осигурала константна запремина при свим нивоима доза.

1.5.6. Хромозомски препарат

Одмах после лишавања живота на хуман начин из једног или оба тестиса узимају се ћелијске суспензије које се излажу хипотоничном раствору и фиксирају. Ћелије се затим нанесу на микроскопска стакла и обоје.

1.5.7. Анализа

За сваку животињу се анализира најмање 100 добро видљивих метафаза (тј. најмање 500 метафаза по групи). Наведени број се може смањити када се уочава велики број аберација. Све препарате (слајдове), укључујући оне позитивне и негативне контроле, потребно је независно шифрирати пре микроскопске анализе. С обзиром да поступци фиксирања често за последицу имају оштећење пропорција метафаза уз губитак хромозома, вредноване ћелије због тога садрже број центромера једнак броју 2n ± 2.

2. ПОДАЦИ

2.1. ОБРАДА РЕЗУЛТАТА

Подаци који се односе на поједине животиње приказују се табеларно. Животиња представља експерименталну јединицу. За сваку појединy животињу потребно је утврдити број ћелија са структурним хромозомским аберацијама и број хромозомских аберација по ћелији. Наводе се различите врсте структурних хромозомских аберација заједно са њиховим бројевима и фреквенцама, а у односу на третиране и контролне групе. Хромозомски прекиди наводе се одвојено и о њима се извештава, али се углавном не укључују у укупну фреквенцу аберација.

Уколико се посматрају и митоза и мејоза, потребно је утврдити однос између митоза сперматогонија у првој и другој мејотској метафази као мерило цитотоксичности за све третиране животиње и животиње негативне контроле на читавом узорку од 100 ћелија у деоби по животињи, да би се утврдили могући цитотоксични ефекти. Уколико се посматра само митоза, потребно је утврдити митотски индекс у најмање 1.000 ћелија за сваку животињу.

2.2. ПРОЦЕНА И ТУМАЧЕЊЕ РЕЗУЛТАТА

Постоји неколико критеријума за утврђивање позитивног резултата, као што је дозно зависно повећање релативног броја ћелија с хромозомским аберацијама или јасно повећање броја ћелија са аберацијама у групи која је примала по једну дозу приликом појединог интервала узорковања. Првенствено се узима у обзир биолошка релевантност резултата. Приликом процене резултата испитивања могу да се примене статистичке методе као помоћно средство[8]. Статистички значај не треба да буде једини фактор помоћу којег се утврђује позитиван одговор. Двосмислени резултати се појашњавају испитивањем, најбоље кроз модификацију експерименталних услова.

Испитивана супстанца за коју резултати не задовољавају наведене критеријуме, сматра се немутагеном у овом испитивању.

Иако већина експеримената даје јасно позитивне или негативне резултате, у ретким случајевима утврђени подаци

онемогућавају доношење коначне одлуке о деловању испитиване супстанце. Резултати могу остати двосмислени или нејасни, без обзира колико је пута експеримент поновљен.

Позитивни резултати испитивања хромозомских аберација у сперматогонијима *in vivo* указују на то да испитивана супстанца узрокује структурне хромозомске аберације у полним ћелијама испитане врсте. Негативни резултати указују на то да, под експерименталним условима, испитивана супстанца не изазива хромозомске аберације у полним ћелијама испитане врсте.

Потребно је размотрити вероватноћу да ће испитивана супстанца или њени метаболити допрети до циљног ткива.

3. ИЗВЕШТАЈ

Извештај о испитивању садржи податке о:

1) Растварачу/вехикулуму:

– оправданост избора вехикулума;

– растворљивост и стабилност испитиване супстанце у растварачу/вехикулуму, уколико је познато.

2) Експерименталним животињама:

– употребљена врста/сој;

– број и старост животиња;

– порекло, смештајни услови, исхрана, итд.;

– појединачна тежина животиња на почетку испитивања, укључујући распон телесне масе и средњу вредност и стандардну девијацију за сваку групу.

3) Условима испитивања:

– подаци истраживања за утврђивање распона, уколико је обављено;

– логичка основа за избор нивоа дозирања;

– логичка основа за избор начина примене испитиване супстанце;

– детаљи припреме испитиване супстанце;

– детаљи примене испитиване супстанце;

– логичка основа времена лишавања живота на хуман начин;

– начин прерачунавања концентрације испитиване супстанце у храни/води за пиће (ppm) у стварну дозу (mg/kg TM/дан), уколико је примењиво на конкретан случај;

– детаљи о квалитету хране и воде;

– детаљан опис распореда третмана и узорковања;

– методе мерења токсичности;

– идентитет супстанце која зауставља метафазу, њена концентрација и трајање третмана;

– методе припреме микроскопских препарата;

– критеријуми за пребројавање аберација;

– број анализираних ћелија по животињи;

– критеријуми за проглашавање испитивања позитивним, негативним или двосмисленим.

4) Резултатима:

– симптоми токсичности;

– митотски индекс;

– однос између митоза сперматогонија у првој и другој мејотској метафази;

– врста и број аберација, засебно приказаних за сваку животињу;

– укупан број аберација по групи;

– број ћелија са аберацијама по групи;

– однос доза/ефекат, где је могуће;

– статистичке анализе, уколико постоје;

– подаци истовремене негативне контроле;

– негативни контролни подаци прошлих истраживања с распонима и средњим вредностима и стандардним девијацијама;

– подаци истовремене позитивне контроле;

– промене у плоидности (броју хромозомске структуре ћелије), уколико су примећене.

5) Образложењу резултата.

6) Закључцима.

4. ЛИТЕРАТУРА

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, pp. 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, pp. 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, 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, pp. 115-141.

5. Yamamoto, K. and Kikuchi, Y. (1978). A New Method for Preparation of Mammalian Spermatogonial Chromosomes. Mutation Res., 52, 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, 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, 313-319.

8. Lovell, 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, pp. 184-232.

B.24. SPOT ТЕСТ НА МИШЕВИМА

1. МЕТОДА ИСПИТИВАЊА

1.1. УВОД

Видети Општи увод.

1.2. ДЕФИНИЦИЈЕ

Видети Општи увод.

1.3. РЕФЕРЕНТНЕ СУПСТАНЦЕ

Нису прописане.

1.4. ПРИНЦИП МЕТОДЕ

Ово је *in vivo* испитивање на мишевима приликом ког се хемикалијама излажу ембриони у развоју. Циљне ћелије у ембрионима у развоју су меланобласти, док су циљни гени они који контролишу пигментацију длаке крзна. Ембриони у развоју су хетерозиготни код низа ових гена који условљавају боју крзна. Мутација или губитак (због низа генетских појава) доминантних алела таквог гена у меланобласту има за последицу експресију рецесивног фенотипа у ћелијама које потом настају, стварајући мрљу другачије боје на крзну добијеног миша. Број потомака с мрљама, мутацијама, преброји се и учесталост њиховог јављања упоређује се с оном која се јавља међу потомцима који настану из ембриона третираних искључиво растварачем. Тест мрље у миша открива претпостављене соматске мутације у феталним ћелијама.

1.5. КРИТЕРИЈУМИ КВАЛИТЕТА

Нису прописани.

1.6. ОПИС МЕТОДЕ

1.6.1. Припреме

Када може, испитиване супстанце се растварају или суспендују у изотоничном раствору. Хемикалије које су нерастворљиве у води растварају се или суспендују у одговарајућим вехикулумима. Вехикулум који се користи не сме да интерферира са испитиваном хемикалијом, нити да узрокује токсичне ефекте. Неопходна је примена свежих препарата испитиване хемикалије.

1.6.1.1. Експериментално животиње

Мишеви Т соја (једнобојни без узорка, a/a; чинчила, ружичасте очи, c^{ch} p/c^{ch} p; смеђи, b/b; благе боје, кратке уши, d se/d se; шарене мрље, s/s) паре се или са HT сојем (бледа боја, једнобојни без узорка, кратки удови, pa a bp/pa a bp; нејасно оловносиви, ln fz/ln fz; седефасти pe/pe) или са C57BL (једнобојни без узорка, a/a). Могу се користити и остали одговарајући облици укрштања, као што су NMRI (једнобојни без узрока, a/a; албино, c/c) и DBA (једнобојни без узорка, a/a; смеђи b/b; благе боје d/d) ако се добију једнобојни потомци.

1.6.1.2. Број и пол

Третира се довољан број гравидних женки како би се осигурао одговарајући број преживелих потомака за сваки дозни ниво која се примењује. Одговарајућа величина узорка регулише се зависно од броја мрља запажених код третираних мишева и распона контролних података. Негативан резултат прихватљив је само када је процењивање спроведено на најмање 300 потомака женки третираних највишом дозом.

1.6.1.3. Примена позитивних и негативних контрола (контролних узорака)

Неопходно је да постоје подаци о истовременим контролама мишева који су третирани само медијумом (негативне контроле). Могу се сјединити контролни подаци из претходних истраживања исте лабораторије како би се повећала осетљивост испитивања, ако су наведена испитивања хомогена. Подаци о позитивној контроли који су недавно добијени у истој лабораторији после третмана хемикалијом која је показала мутагеност овим тестом, треба да буду доступни уколико се не примети мутагеност испитиване хемикалије.

1.6.1.4. Пут примене

Уобичајени путеви примене укључују оралну интубацију или интраперитонеално убризгавање супстанце гравидним женкама. Обављање третмана инхалацијом или другим путевима примене користи се када то одговара.

1.6.1.5. Дозни нивои

Примењују се бар два дозна нивоа, укључујући једну код које се јављају симптоми токсичности или смањење величине легла. Код нетоксичних хемикалија потребно је излагање максималној могућој дози.

1.6.2. Поступак

Обавља се један третман током осмог, деветог или десетог дана трудноће, при чему се као први дан броји онај дан када је први пут примећен вагинални „чеп". Ови дани одговарају времену од 7,25, 8,25 и 9,25 дана после зачећа. Могу се применити и сукцесивни третмани током наведених дана.

1.6.2.1. Анализа

Потомци се шифрирају и посматрају на постојање мрља између треће и четврте недеље после рођења. Разликују се три категорије мрља:

а) беле мрље унутар 5 mm од средишње вентралне (трбушне) линије за које се претпоставља да су последица убијања ћелија (у даљем тексту:WMVS);

б) жуте мрље, налик агути боји, везане уз подручја груди, гениталија, грла, подручја пазуха и препона и на средини чела; за њих се претпоставља да су последица погрешне диференцијације (у даљем тексту: MDS);

в) пигментне и беле мрље случајно распоређене по крзну за које се претпоставља да су последица соматских мутација (у даљем тексту: RS).

Вредновање се обавља у све три категорије, али је само последња, RS, од генетске важности. Потешкоће у разликовању MDS и RS могу се решити флуоресцентном микроскопијом узорака длаке.

Неопходно је забележити очигледне макро морфолошке абнормалности потомака.

2. ПОДАЦИ

Подаци се наводе у облику укупног броја вреднованих потомака и броја код кога се појавила једна или више мрља за које се претпоставља да су последица соматске мутације. Подаци о третирању упоређују се са подацима негативне контроле применом одговарајућих метода. Подаци се приказују на основи појединих легала.

3. ИЗВЕШТАЈ

3.1. ИЗВЕШТАЈ О ИСПИТИВАЊУ

Извештај о испитивању, уколико је могуће, садржи податке о:

– сојевима употребљеним за укрштање;

– броју гравидних женки у експерименталним и контролним групама;

– просечној величини легла у експерименталним и контролним групама приликом окота и престанка дојења;

– нивоима доза испитиване хемикалије;

– употребљеном растварачу;

– дану гравидности на који је третман примењен;

– начину примене третмана;

– укупном броју вреднованих потомака и броју са WMVS, MDS и RS у експерименталним и контролним групама;

– уочљивим морфолошке абнормалностима;

– односу дозе/ефекат код RS-а када је могуће;

– статистичкој процени;

– образложењу резултата;

– тумачењу резултата.

3.2. ПРОЦЕНА И ТУМАЧЕЊЕ РЕЗУЛТАТА

Видети Општи увод.

4. ЛИТЕРАТУРА

Видети Општи увод.

B.25. НАСЛЕЂЕНА ТРАНСЛОКАЦИЈА КОД МИША

1. МЕТОДА ИСПИТИВАЊА

1.1. УВОД

Видети Општи увод.

1.2. ДЕФИНИЦИЈЕ

Видети Општи увод.

1.3. РЕФЕРЕНТНЕ СУПСТАНЦЕ

Нису прописане.

1.4. ПРИНЦИП МЕТОДЕ

Испитивање наслеђене транслокације код миша открива структурне и нумеричке хромозомске промене у полним ћелијама сисара које се појављују код потомства прве генерације. Врсте откривених хромозомских промена обухватају реципрочне транслокације и, уколико је укључено потомство женског пола, губитак хромозома X. Код носилаца транслокација и XO-женки јавља се смањена плодност која се користи за избор F_1 потомства у сврху цитогенетске анализе. Потпуну стерилност изазивају одређене врсте транслокација (аутозомни ген X (аутозом) и c-t тип). Транслокације се цитогенетски посматрају у мејотским ћелијама током дијакинезе – метафазе 1 код јединки мужјака, било F_1 мужјака или потомака мушког пола F_1 женки. XO-женке цитогенетски се идентификују на основу постојања само 39 хромозома током митоза коштане сржи.

1.5. КРИТЕРИЈУМИ КВАЛИТЕТА

Нису прописани.

1.6. ОПИС МЕТОДЕ

1.6.1. Припреме

Хемикалије које се испитују растварају се у изотоничном раствору. Уколико су хемикалије нерастворљиве, суспендују се у одговарајућим вехикулумима. Користе се свеже припремљени раствори испитиване супстанце. Уколико се због лакшег дозирања користи вехикулум, он не сме да интерферира са испитиваним једињењем, нити да узрокује токсичне ефекте.

1.6.1.1. Пут примене

Путеви примене обично обухватају оралну интубацију или интраперитонеалне инјекције. Могу да одговарају и други путеви примене.

1.6.1.2. Експериментални животиње

Због лакшег размножавања и цитолошке верификације, експерименти се обављају на мишевима. Није потребан

никакав специфични мишји сој. Просечна величина легла соја је већа од осам и релативно је константна.

Користе се здраве и полно зреле животиње.

1.6.1.3. Број животиња

Потребан број животиња зависи од учесталости спонтаних транслокација и најнижег степена индукције потребне за позитиван резултат.

Испитивање се обично обавља анализом мушког F_1 потомства. По свакој дозираној групи потребно је испитати најмање 500 мушких F_1 потомака. Уколико је у испитивање укључено и женско F_1потомство, потребно је 300 мужјака и 300 женки.

1.6.1.4. Примена позитивних и негативних контрола

Потребни су одговарајући контролни подаци добијени на основу истовремене контроле и контроле из прошлих испитивања. Кад постоје прихватљиви резултати позитивне контроле из недавно изведених испитивања у истој лабораторији, могу се употребити ови резултати уместо истовремене позитивне контроле.

1.6.1.5. Дозни нивои

Испитује се једна доза, обично највиша доза која је у вези са изазивањем минималних токсичних ефеката, али без утицаја на репродуктивно понашање или преживљавање. Како би се успоставио однос између дозе и ефекта, потребне су и две додатне ниже дозе. Код нетоксичних хемикалија потребно је излагање максималној могућој дози.

1.6.2. Поступак

1.6.2.1. Третирање и парење

Постоје два плана третирања. Највише се користи појединачна примена испитиване супстанце. Испитивана супстанца се може примењивати седам дана недељно током периода од 35 дана. Број парења који следи после третмана одређен је планом третмана. Обезбеђује се обављање узорковања у свим третираним стадијумима полних ћелија. На крају периода парења женке се појединачно стављају у кавезе. Када се женке окоте, бележи се датум, величина легла и пол потомства. Сви мушки потомци се одбијају од сисе, док се сви женски потомци одбацују, осим уколико су обухваћени испитивањем.

1.6.2.2. Испитивање хетерозиготности код транслокације

Користи се једна од две могуће методе:

а) Испитивање плодности F_1 потомства и накнадна верификација могућих носилаца транслокације цитогенетском анализом;

б) Цитогенетска анализа свих мушких F_1 потомака без претходне селекције на основу испитивања плодности.

а) Испитивање плодности

Смањена плодност F_1 јединки може се утврдити праћењем величине легла и/или анализом материчног садржаја женских испитаника.

Неопходно је утврдити критеријуме за одређивање нормалне и смањене плодности за сој мишева који се користи.

Праћење величине легла: F_1 мужјаци, на којима ће бити изведено испитивање, појединачно се затварају у кавезе заједно са женкама из истог експеримента или из колоније. Кавези се свакодневно проверавају, почевши 18 дана после парења. Приликом окота бележи се величина легла и пол F_2 потомства и легла се после тога одбацују. Уколико се испитује женско F_1 потомство, F_2 потомство из малих легала задржава се због даљих испитивања. Женски носиоци транслокација проверавају се цитогенетском анализом транслокације код сваког од њихових мушких потомака. ХО-женке препознају се по промени односа међу половима њиховог потомства из 1:1 у 1:2 у корист потомака мушкога пола. У секвенцијалном поступку нормалне F_1 животиње елиминишу се из даљег испитивања уколико прво F_2 легло достигне или премаши унапред одређену нормалну вредност. У супротном, обавља се посматрање другог или трећег F_2 легла.

F_1 животиње које се не могу класификовати као нормалне после праћења максимално три F_2 легла, или се даље испитују анализом материчног садржаја женских испитаника или се директно подвргавају цитогенетској анализи.

Анализа материчног садржаја: до смањења величине легла носилаца транслокације долази због смрти ембриона тако да висок број мртвих имплантата упућује на постојање транслокације код животиње која се испитује. Сваки F_1 мужјак на којем се обавља испитивање пари се са две до три женке. Зачеће се утврђује на основу свакодневних провера на постојање вагиналних „чепова” у јутарњим сатима. Женке се лишавају живота на хуман начин 14 до 16 дана касније и региструју се живи и мртви имплантати у њиховим материцама.

б) Цитогенетска анализа

Препарати садржаја тестиса припремају се техником ваздушног сушења. Носиоци транслокација препознају се по постојању мултивалентних структура при дијакинези – метафази 1 у примарним сперматоцитима. Опажање најмање две ћелије са мултивалентном асоцијацијом довољан је доказ да је испитана животиња носилац транслокације.

Уколико није обављена ни једна селекција током узгоја, сви F_1 мужјаци се проверавају цитогенетски. Неопходно је микроскопски открити постојање најмање 25 ћелија у метафази 1 дијакинезе по мужјаку. Неопходан је преглед митотских метафаза у сперматогонијима или коштаној сржи F_1 мужјака с малим тестисима и мејотском разградњом пре дијакинезе или F_1 женки за које се сумња да су ХО. Постојање необично дугог и/или кратког хромозома у свакој од десет ћелија доказ је посебне транслокације код мужјака која изазива стерилност (ц-т тип). Неке транслокације аутозома Х које узрокују стерилност мужјака могу се препознати само анализом која примењује пругање митотских хромозома.

Постојање 39 хромозома у свих 10 митоза доказ је постојања ХО стања код женке.

2. ПОДАЦИ

Подаци се наводе табеларно.

За сваки период парења, после парења родитеља, региструје се средња величина легла и однос полова приликом окота и престанка дојења.

За процену плодности F_1 животиња наводи се средња величина легла свих нормалних парења и појединачне величине легла F_1 носилаца транслокација. За анализу материчног садржаја извештава се о просечном броју живих и мртвих имплантата после нормалних парења и о појединачним бројевима живих и мртвих имплантата за свако парење F_1 носилаца транслокације.

За цитогенетску анализу дијакинезе-метафазе 1 бележи се број врста мултивалентних структура и укупан број ћелија за сваког носиоца транслокације.

За стерилне F_1 јединке бележи се укупан број парења и трајање периода парења. Наводи се маса тестиса и детаљи цитогенетске анализе.

За ХО женке бележи се средња величина легла, однос полова F_1 потомства и резултати цитогенетске анализе.

Кад је могуће, F_1 носиоци транслокације претходно се бирају на основу испитивања плодности и табеле обухватају податке о томе колики број њих су потврђени хетерозиготи транслокације.

Наводе се и подаци негативних и позитивних контрола испитивања.

3. ИЗВЕШТАЈ

3.1. ИЗВЕШТАЈ О ИСПИТИВАЊУ

Извештај о испитивању, уколико је могуће, садржи податке о:

– мишјем соју, старости животиња, маси третираних животиња;

– броју животиња родитеља сваког пола у експерименталним и контролним групама;

– условима испитивања, детаљан опис третмана, нивоа доза, растварача, распоред парења;

– броју и полу потомака по свакој женки, броју и полу потомака узгојених у сврху анализе транслокације;

– времену и критеријумима анализе транслокације;

– броју и детаљном опису носилаца транслокације, укључујући податке о парењу и податке о материчном садржају, у зависности од конкретног случаја;

– цитогенетским поступцима и детаљима микроскопске анализе, по могућству уз слике;

– статистичкој процени;

– образложењу резултата;

– тумачење резултата.

3.2. ПРОЦЕНА И ТУМАЧЕЊЕ РЕЗУЛТАТА

Видети Општи увод.

4. ЛИТЕРАТУРА

Видети Општи увод.

B.26. СУБХРОНИЧНА ОРАЛНА ТОКСИЧНОСТ ПОНОВЉЕНИХ ДОЗА – СТУДИЈА ОРАЛНЕ ТОКСИЧНОСТИ НА ГЛОДАРИМА, 90 ДАНА

1. МЕТОДА ИСПИТИВАЊА

Метода испитивања субхроничне оралне токсичности заснива се на Упутству за испитивање OECD 408 (1998).

1.1. УВОД

Приликом вредновања и процене токсичних својстава хемикалије субхронична орална токсичност може да се одреди

применом поновљених доза, а након што су, на основу 28-дневних испитивања токсичности, применом акутне или поновљених доза, добијени почетни подаци о токсичности. Деведесетодневно испитивање даје податке о могућим опасностима по здравље које ће вероватно произаћи из понављане дуготрајне изложености током периода сазревања после престанка дојења и периода раста, поприлично захватајући одрасло доба. Испитивање даје податке о значајнијим токсичним ефектима, назначава циљне органе и могућност кумулације, и може да обезбеди процену нивоа експозиције при којем нису примећени нежељени ефекти, а који се може применити приликом избора нивоа дозе за хронична испитивања, као и за утврђивање критеријума сигурности код излагања људи.

Метода ставља додатни акценат на неуролошке крајње тачке и указује на имунолошке и репродуктивне ефекте. Наглашава се и потреба за пажљивим клиничким праћењем животиња, с циљем прикупљања што веће количине података. Ово испитивање омогућава препознавање хемикалија које имају потенцијал узроковања неуротоксичних и имунолошких ефеката, као и ефеката на репродуктивним органима, што може оправдати даља детаљна истраживања.

Видети Општи увод.

1.2. ДЕФИНИЦИЈЕ

Доза јесте количина испитиване супстанце која се примењује. Доза се изражава као маса (g, mg) или као маса испитиване супстанце по јединици телесне масе експерименталне животиње (нпр. mg/kg) или у облику константних концентрација излагања путем исхране (ppm).

Дозирање јесте општи појам који обухвата дозу, њену учесталост и временско трајање дозирања.

NOAEL јесте скраћеница за ниво при којем нису примећени нежељени ефекти и представља највиши ниво дозе при којој нису примећени никакви штетни налази везани за третман.

1.3. ПРИНЦИП МЕТОДЕ

Испитивана супстанца примењује се свакодневно оралним путем у растућим дозама код неколико група експерименталних животиња и то по један дозни ниво по групи током 90 дана. Током периода примене, животиње се пажљиво посматрају због уочавања симптома токсичности. На животињама које угину или буду лишене живота на хуман начин током испитивања обавља се постмортални преглед, док се, по завршетку испитивања, преживеле животиње такође лишавају живота на хуман начин и постмортално прегледају.

1.4. ОПИС МЕТОДЕ

1.4.1. Припрема животиња

Приликом испитивања неопходно је користити здраве животиње које су се аклиматизовале на лабораторијске услове најмање пет дана и нису биле предмет претходних експерименталних поступака. Експерименталне животиње потребно је окарактерисати као врсту, сој, порекло, пол, телесну масу и/или старост. Животиње се случајним избором додељују контролним групама и групама које се третирају. Кавези су размештени на начин којим ће могући ефекти који произлазе из положаја кавеза бити сведени на најмању могућу меру. Свакој животињи додељује се јединствени идентификациони број.

1.4.2. Припрема доза

Испитивана супстанца даје се путем интубационе цеви или путем хране или воде за пиће. Метода оралне примене зависи од сврхе испитивања, као и од физичких и хемијских својстава испитиваног материјала.

Када је потребно, испитивана супстанца се раствара или суспендује у одговарајућем вехикулуму. Препоручује се да се, кад год је могуће, узме у обзир примена воденог раствора/суспензије, после чега се разматра раствор/емулзија у уљу (нпр. кукурузно уље), а тек после тога могуће је растварање у осталим вехикулумима. За све вехикулуме, осим воде, морају бити позната токсична својства. Неопходно је утврдити стабилност испитиване супстанце у условима примене.

1.4.3. Услови испитивања

1.4.3.1. Експериментална животиње

Најпогоднија животињска врста је пацов, иако се могу применити и остале врсте глодара, на пример мишева. Користе се младе здраве одрасле животиње лабораторијских сојева који се обично употребљавају. Бирају се женке које нису раније рађале и које нису гравидне. Са дозирањем се започиње што је пре могуће после престанка дојења, а пре него што животиње наврше девет недеља. Приликом започињања испитивања, одступање у телесној маси животиња које се користе треба да буде минимално и не сме да одступа више од ± 20% просечне телесне масе сваког пола. Када се истраживање обавља као прелиминарно, пре дуготрајног испитивања хроничне токсичности, у оба испитивања се употребљавају животиње које су истог соја и истог порекла.

1.4.3.2. Број и пол

Приликом испитивања сваке дозе употребљава се најмање 20 животиња (десет женки и десет мужјака). Уколико се планира лишавање живота на хуман начин у међувремену, број је потребно повећати за број животиња чије се лишавање живота планира пре завршетка испитивања. На основу претходног знања о хемикалији или блиском аналогу, потребно је размотрити укључивање додатне пратеће групе од десет животиња (пет по полу) у контролну групу и групу која прима највишу дозу, због праћења реверзибилности или постојаности било ког од токсичних ефеката по истеку периода третирања. Трајање овог периода после третирања утврђује се у складу са запаженим ефектима.

1.4.3.3. Нивои дозирања

Потребно је користити најмање три нивоа дозе и истовремену контролу, осим у случајевима у којима се обавља испитивање граничне дозе (видети одељак 1.4.3.4. ове методе). Нивои дозе могу да се темеље на резултатима испитивања с поновљеним дозирањем или резултатима испитивања намењеног утврђивању распона. Узимају се у обзир сви постојећи токсиколошки и токсикокинетички подаци који постоје за испитивану супстанцу или материјал с њом у вези. Највиша доза бира се са циљем да изазове токсичност, али не и смрт или озбиљне тегобе, осим уколико није ограничена физичким и хемијским карактеристикама или биолошким ефектима испитиване супстанце. Опадајући низ доза бира се с циљем да се докажу било какве реакције повезане с дозирањем, као и највиши ниво на коме нису примећени нежељени ефекти (у даљем тексту: NOAEL) при најнижем нивоу дозе. За успостављање силазних нивоа доза најчешће су оптимални двоструки интервали, па све до четвороструких, док је додавање четврте експерименталне групе препоручљивије од коришћења врло великих интервала између дозирања

Контролна група је она која се не третира или контролна група која се третира само вехикулумом уколико се исти користи приликом давања испитиване супстанце. Изузев третирања испитиваном супстанцом, са животињама у контролној групи поступа се на исти начин као и са експерименталним групама. Уколико се користи вехикулум, контролна група прима вехикулум у највишој запремини која се примењује. Уколико се испитивана супстанца даје заједно са храном и узрокује смањен унос хране тада се, за разликовање смањеног уноса узрокованог укусом и оног услед токсиколошких промена код експерименталног модела, користи паралелно храњена контролна група.

У обзир се узимају следећа својства вехикулума и осталих додатака, у зависности од случаја: ефекти на апсорпцију, расподелу, метаболизам или задржавање испитиване супстанце; ефекта на хемијска својства испитиване супстанце који могу променити њена токсична својства и ефекти на потрошњу хране и воде или стање ухрањености животиња.

1.4.3.4. Испитивање граничне дозе

Уколико због експеримента с једним нивоом дозе, која је најмање једнака 1.000 mg/kg TM/дневно, а који се користи у поступцима описаним за ово испитивање, не настану никакви приметни нежељени ефекти и уколико се токсичност не очекује на основу података о структурно сличним супстанцама, тада се не сматра неопходним целокупно испитивање које примењује три нивоа дозирања. Испитивање граничне дозе није применљив у случајевима кад изложеност људи указује на потребу за применом вишег нивоа дозе.

1.5. ПОСТУПАК

1.5.1. Примена доза

Животињама се испитивана супстанца даје свакодневно, седам дана недељно током периода од 90 дана. Било који други режим дозирања, на пример, пет дана недељно, потребно је оправдати. Када се испитивана супстанца примењује путем интубацијске цеви (присилно храњење), исту је потребно дати у облику једне дозе животињама које користе желудачну цев или одговарајућу интубацијску канилу. Максимална запремина течности која ес може дати одједном зависи од величине експерименталне животиње. Запремина не сме да буде већа од 1ml/100g TM, осим у случају водених раствора када је могуће применити 2 ml/100g TM. Изузев у случају иритативних или корозивних супстанци код којих се неповољни ефекти обично показују при вишим концентрацијама, варијабилност експерименталне запремине је сведена на најмању могућу меру прилагођавањем концентрације, а како би се осигурала константна запремина при свим нивоима доза.

Код супстанци које се примењују путем хране или воде за пиће важно је осигурати да количине испитиване супстанце о којој је реч не ометају редовну исхрану и равнотежу воде. Када се испитивана супстанца даје путем хране, може да се примени константна прехрамбена концентрација (ppm) или константни дозни ниво у односу на телесну масу животиње. Алтернатива која се користи се назначава. У случају супстанце која се даје присилним храњењем (интубацијском цеви), дозу је потребно дати сваки дан у исто време и по потреби прилагодити како би се одржала константна доза у односу на телесну масу животиње. Када се 90-дневно испитивање користи као прелиминарно испитивање дуготрајног испитивања хроничне токсичности, препоручљиво је у оба испитивања применити сличан начин исхране.

1.5.2. Посматрања

Праћење траје најмање 90 дана. Животиње у пратећој групи за које се планирају додатна посматрања потребно је, одговарајуће време, држати без третмана, а како би се открила постојаност или опоравак од токсичних ефеката.

Општа клиничка посматрања обављају се најмање једном дневно, најбоље у исто време сваког дана, узимајући у обзир најзначајнији период очекиваних ефеката после дозирања. Неопходно је забележити клиничко стање животиња. Најмање двапут дневно, обично почетком и крајем сваког дана, све животиње се проверавају на симптоме морбидитета и морталитета.

Најмање једном пре првог излагања (како би се омогућило поређење код истих испитаника) и једном недељно после тога, потребно је детаљно клиничко снимање стања свих животиња. Наведена посматрања потребно је обавити изван кавеза у којем животиња иначе борави, најбоље у стандардном окружењу и сваки пут у слично време. Посматрања се пажљиво региструју, најбоље коришћењем система вредновања, изричито дефинисаних од стране лабораторије која обавља испитивање. Неопходно је уложити одређени напор како би се обезбедило да су одступања у условима посматрања минимална. Симптоми који се бележе обухватају, али нису ограничени на, промене на кожи, крзну, очима, мукозним мембранама, појави секрета или екскрета и аутономну активност (нпр. сужење, пилоерекција, величина зеница, необична респираторна структура). Региструју се и промене у ходу, држању и реакцији на манипулисање, као и постојање клоничких или тоничких покрета, шаблоне у понашању (нпр. претерано неговање спољашности, поновљено кружење) или необично понашање (нпр. самоозлеђивање, ходање унатраг)[1].

Офталмолошки преглед, коришћењем офталмоскопа или подједнако одговарајуће опреме, потребно је обавити пре примене испитиване супстанце и по завршетку испитивања, најбоље код свих животиња, али најмање у групама које примају високу дозу и контролним групама. Уколико се примете промене на очима, неопходан је преглед свих животиња.

При крају периода излагања, а у сваком случају не раније од једанаесте недеље, обавља се оцена сензорне реактивности на подражаје различитих врста[1] (нпр. звучне, визуелне и проприоцептивне подражаје)[2, 3, 4], оцену јачине стиска[5] и оцену моторне активности[6]. Даље појединости о поступцима наведене су у литератури. Могу се применити и алтернативни поступци различити од оних из литературе.

Могу се изоставити функционална посматрања која се обављају при крају испитивања кад постоје подаци о функционалним посматрањима из других истраживања, а дневна клиничка посматрања нису открила никакве функционалне недостатке.

Изузетно, функционална посматрања могу се изоставити и код група које на други начин показују симптоме токсичности до мере која би знатно ометала обављање функционалног испитивања.

1.5.2.1. Телесна маса и потрошња хране/воде

Све животиње се мере најмање једном недељно. Мерење потрошње хране потребно је обављати најмање једном недељно. Уколико се испитивана супстанца даје путем воде за пиће, мери се и потрошња воде, и то најмање на недељном нивоу. Потрошња воде може се разматрати и у испитивањима која се односе на исхрану или присилно храњење током којих може доћи до промене у активности узимања течности.

1.5.2.2. Хематологија и медицинска биохемија

Узорке крви потребно је узети с наведеног извора и чувати под одговарајућим условима, у зависности од конкретног случаја. На крају периода испитивања узорци се прикупљају непосредно пре или у оквиру поступка лишавања животиња живота на хуман начин.

На крају периода испитивања, и увек када су у међувремену прикупљени било какви узорци крви, неопходно је обавити следећа хематолошка испитивања: хематокрит, концентрација хемоглобина, број еритроцита, укупни и диференцијални број леукоцита, број тромбоцита и одређивање времена/потенцијала згрушавања крви.

Медицинско-биохемијска одређивања која се изводе у циљу истраживања значајнијих токсичних ефеката у ткивима, односно у циљу истраживања ефеката на бубреге и јетру, потребно је обавити на узорцима крви сваке животиње непосредно пре лишавања живота на хуман начин или у оквиру поступка лишавања живота животиња (осим код животиња које су умирале и/или су лишене живота на хуман начин). Слично хематолошким испитивањима, може се обавити узорковање у међувремену и у сврху медицинско-биохемијских испитивања. Препоручује се ускраћивање хране животињама током ноћи пре узимања узорака крви.[II] Одређивања у плазми или серуму обухватају: натријум, калијум, глукозу, укупни холестерол, уреу, азот из урее у крви (у даљем тексту: BUN), креатинин, укупне протеине и албумин и више од два ензима индикатора хепатоцелуларних ефеката (попут аланин аминотрансферазе, аспартат аминотрансферазе, алкалне фосфатазе, гама глутамил транспептидазе и сорбитол дехидрогеназе). Могу се обавити и мерења додатних ензима (јетреног или другог порекла) и жучних киселина, а који, под одређеним околностима, могу дати корисне податке.

Опционо, током последње недеље испитивања прикупљањем запремине урина у ограниченом временском периоду могу се обавити следећа одређивања у оквиру анализе урина: изглед, волумен, осмолалност или специфична тежина, pH, протеини, глукоза и крв/крвне ћелије. Потребно је размотрити и испитивања серумских маркера општих оштећења ткива. Остала одређивања која је потребно обавити, уколико су позната својства испитиване супстанце или постоји сумња да утичу на сродне метаболичке профиле, обухватају калцијум, фосфор, вредност триглицерида на празан желудац, специфичне хормоне, метхемоглобин и холинестеразе. Наведено је потребно идентификовати код хемикалија које припадају одређеним категоријама или у зависности од случаја.

Потребан је флексибилан приступ у зависности од животињске врсте и примећених односно очекиваних ефеката испитиване супстанце.

Уколико основни подаци ранијих студија не одговарају, разматра се потреба за утврђивањем хематолошких и клиничко биохемијских параметара пре почетка дозирања. Не препоручује се утврђивање ових података пре третмана[7].

_____

II Код низа мерења у серуму и плазми, посебно у случају глукозе, препоручује се ускраћивање хране током ноћи. Главни разлог је чињеница да повећана варијабилност, која неизбежно настаје као последица узимања хране, може прикрити нешто суптилније ефекте и отежати тумачење. С друге стране, гладовање током ноћи може ометати општи метаболизам животиња и, посебно у студијама које се баве исхраном, нарушити дневно излагање испитиваној супстанци. Уколико се усвоји гладовање током ноћи, медицинско-биохемијска испитивања изводе се после обављања функционалних испитивања.

1.5.2.3. Постмортални преглед (постмортални преглед)

Све животиње обухваћене испитивањем подвргавају се детаљном постморталном прегледу који укључује пажљив преглед спољне површине тела, свих телесних отвора и кранијалне, торакалне и абдоминалне шупљине и њихових садржаја. Са јетре, бубрега, надбубрежне жлезде, тестиса, епидидимиса, утеруса, оваријума, грудне жлезде, слезине, мозга и срца сваке животиње (осим животиња које су затечене на самрти и/или су интеркурентно лишене живота на хуман начин) потребно је одстранити сва припадајућа ткива, зависно од случаја, и измерити њихову масу у влажном стању што је пре могуће после дисекције како би се избегло исушивање.

У медијуму за фиксацију који је најпогоднији с обзиром на врсту ткива и хистопатолошко испитивање које следи потребно је сачувати следећа ткива: све макро лезије, мозак (репрезентативна подручја, укључујући велики мозак, мали

мозак и медулу/мост), кичмену мождину (на три нивоа: цервикалној регији, средини торакалне регије и лумбалној регији), хипофизу, штитну жлезду, паратироидну жлезду, грудну жлезду, једњак, пљувачне жлезде, желудац, танко и дебело црево (укључујући Peyerove плоче), јетру, гуштерачу, бубреге, надбубрежне жлезде, слезину, срце, душник и плућа (очувана надувавањем фиксиром и затим урањањем), аорту, полне жлезде, утерус, помоћне полне органе, женске млечне жлезде, простату, мокраћну бешику, жучну бешику (миш), лимфне жлезде (најбоље једна лимфна жлезда која покрива пут којим се супстанца примењује и друга која је удаљена од пута којим се супстанца примењује како би се обухватили системски ефекти), периферне нерве (исхијатични или тибијални нерв) најбоље у близини мишића, узорак коштане сржи (и/или свежи аспират коштане сржи), кожу и очи (уколико су на њима примећене промене током офталмолошких прегледа). Клинички и остали налази могу да укажу на потребу испитивања додатних ткива. Потребно је сачувати и све органе за које постоји вероватноћа да су циљни органи, а на основу познатих својстава испитиване супстанце.

1.5.2.4. Хистопатологија

Потребно је обавити целовиту хистопатологију на сачуваним органима и ткивима свих животиња у контролним групама и групама које су примале високе дозе. Наведеним испитивањима обухватају се животиње свих осталих група дозирања, уколико су код групе која је примала високу дозу примећене промене везане за третман.

Неопходно је испитати све веће лезије.

Ако се користи пратећа група, хистопатологија се обавља на ткивима и органима на којима је примећено испољавање ефеката у третираним групама.

2. ПОДАЦИ

Подаци се наводе појединачно, табеларно, тако што се наводе: број животиња на почетку испитивања у свакој испитиваној групи, број животиња које су пронађене мртве током испитивања или су лишене живота из хуманих разлога, као и време сваке смрти или лишавања живота на хуман начин, број животиња код којих су се појавили симптоми токсичности, опис примећених симптома токсичности, укључујући време њиховог наступања, трајање и озбиљност сваког токсичног ефекта, број животиња код којих су се јавиле лезије, врста лезија и процент животиња код којих се појавила свака врста лезија.

Када одговара, нумерички резултати се процењују помоћу одговарајуће и општеприхваћене статистичке методе. Статистичке методе и подаци који се анализирају бирају се током осмишљавања испитивања.

3. ИЗВЕШТАЈ

Извештај о испитивању садржи податке о:

1) Испитиваној супстанци:

– физичка својства, чистоћа и физичка и хемијска својства;

– подаци за идентификацију;

– вехикулум (уколико одговара): разлози за избор вехикулума, уколико није реч о води.

2) Врсти животиња које се испитују:

– употребљена врста и сој;

– број, старост и пол животиња;

– порекло, услови смештаја, исхрана, итд.;

– појединачна телесна маса животиња на почетку испитивања.

3) Условима испитивања:

– логичка основа за избор нивоа доза;

– детаљи о припремању испитиване супстанце/припремању хране, постигнута концентрација, стабилност и хомогеност препарата;

– детаљи о начину примене испитиване супстанце на животињама;

– стварне дозе (mg/kg ТМ/дневно) и фактор прерачунавања концентрације испитиване супстанце у храни/води за пиће (ppm) у стварну дозу, уколико је примењиво на конкретан случај;

– детаљи о квалитету хране и воде.

4) Резултатима:

– телесна маса и промене у телесној маси;

– потрошња хране и воде, ако је меродавно;

– подаци о токсичној реакцији по полу и нивоу дозе, укључујући симптоме токсичности;

– природа, озбиљност и трајање клиничких запажања (било у случају пролазних, било непролазних ефеката);

– резултати офталмолошког прегледа;

– оцене сензорне активности, јачине стиска и моторних активности (кад је могуће);

– хематолошка испитивања са релевантним основним вредностима;

– медицинско биохемијска испитивања са релевантним основним вредностима;

– телесна маса по лишавању живота на хуман начин, маса органа и однос масе органа/ТМ;

– обдукциони налази;

– детаљан опис свих хистопатолошких налаза;

– подаци о апсорпцији уколико постоје;

– статистичка обрада резултата, када одговара.

5) Образложењу резултата.

6) Закључцима.

4. ЛИТЕРАТУРА

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 N eurobiol. Exp., 40 , 999-1003.

3. Gad, S.C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J.Toxicol. Environ. Health, 9 , 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, 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., 1 , 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, 59 9-609.

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 , 198-201.

B.27. СУБХРОНИЧНА ОРАЛНА ТОКСИЧНОСТ ПОНОВЉЕНИХ ДОЗА –СТУДИЈА ОРАЛНЕ ТОКСИЧНОСТИ НА НЕ-ГЛОДАРИМА, 90 ДАНА

1. МЕТОДА ИСПИТИВАЊА

Метода испитивања субхроничне оралне токсичности заснива се на Упутству за испитивање OECD 409 (1998).

1.1. УВОД

Приликом вредновања и оцене токсичних својстава хемикалије могу се одредити субхроничне оралне токсичности применом поновљених доза, а након што су, на основу 28-дневних испитивања токсичности, применом акутне или поновљених доза, добијени почетни подаци о токсичности. Деведесетодневно испитивање даје податке о могућим опасностима по здравље које вероватно произилазе из понављане изложености током периода убрзаног раста и уласка у млађе одрасло доба. Испитивање даје податке о значајнијим токсичним ефектима, назначава циљне органе и могућност кумулације, и може да пружи процену нивоа експозиције при коме нису опажени нежељени ефекти, а који се може применити приликом избора нивоа дозе за испитивања у којима се примењују хроничне дозе, као и приликом утврђивања критеријума безбедности код излагања људи.

Експериментална метода омогућава препознавање штетних ефеката који се јављају код врста које нису глодари приликом излагања хемикалијама. Потребно је ову методу користити искључиво:

– кад ефекти примећени у другим испитивањима указују на потребу за разјашњењем/ карактеризацијом код друге врсте која не припада роду глодара или

– када токсикокинетичка испитивања показују да је коришћење специфичне врсте не-глодара најрелевантнији избор лабораторијске животиње или

– у случајевима кад остали специфични разлози оправдавају употребу одређене врсте не-глодара.

Видети Општи увод.

1.2. ДЕФИНИЦИЈЕ

Доза јесте количина испитиване супстанце која се примењује. Доза се изражава као маса (g, mg) или као маса

испитиване супстанце по јединици телесне масе експерименталне животиње (нпр. mg/kg) или у облику константних прехрамбених концентрација (ppm).

Дозирање јесте општи појам који обухвата дозу, њену учесталост и временско трајање дозирања.

NOAEL јесте скраћеница за ниво на којем нису опажени нежељени ефекти и представља највиши ниво дозе при којој не постоје никакви штетни налази везани за третман.

1.3. ПРИНЦИП МЕТОДЕ

Испитивана супстанца примењује се дневно оралним путем и у прогресивним дозама код неколико група експерименталних животиња, и то један дозни ниво по групи током 90 дана. Током периода примене животиње се пажљиво посматрају због уочавања симптома токсичности. На животињама које угину или буду лишене живота на хуман начин током испитивања обавља се постмортални преглед, док се, по закључењу испитивања, преживеле животиње такође лишавају живота на хуман начин и постмортално прегледају.

1.4. ОПИС МЕТОДЕ

1.4.1. Избор животињске врсте

Најчешће коришћена врста не-глодара је пас који треба да буде одређене пасмине. Често се користи бигл (кратконоги пас зечар). Остале врсте, попут свиња и патуљастих свиња такође се могу користити. Коришћење примата се не препоручује и њихова примена се оправдава. Неопходно је користити младе здраве животиње. У случају паса с дозирањем је најбоље започети при старости од 4 до 6 месеци и не касније од 9 месеци старости. Кад се истраживање обавља као прелиминарно, пре дуготрајног испитивања хроничне токсичности, у оба испитивања се употребљава иста врста/пасмина животиња.

1.4.2. Припрема животиња

Приликом испитивања обавезно се користе здраве младе животиње које су се аклиматизовале на лабораторијске услове и које нису биле предмет претходних експерименталних поступака. Трајање аклиматизације зависи од одабране експерименталне животињске врсте и њеног порекла. Препоручује се аклиматизација у трајању од најмање пет дана за псе или свиње узгојене у ту сврху, а које припадају колонији животиња трајно смештеној на локацији испитивања, и најмање две недеље за исте животиње уколико потичу из спољашњих извора. Експерименталне животиње се означавају с обзиром на њихову врсту, сој, порекло, пол, тежину и/или старост. Животиње се насумично додељују контролним групама и групама које се третирају. Кавези су размештени на начин којим ће могући ефекти који произлазе из положаја кавеза бити сведени на најмању могућу меру. Свакој животињи се додељује јединствени идентификациони број.

1.4.3. Припрема доза

Испитивана супстанца се даје путем хране или воде за пиће, присилним храњењем (путем интубацијске цеви) или у облику капсула. Метода оралне примене зависи од сврхе испитивања, као и од физичких и хемијских својстава испитиване супстанце.

Када је потребно, испитивана супстанца се раствара или суспендује у одговарајућем медијуму. Препоручује се да се, кад год је могуће, узме у обзир примена воденог раствора/суспензије, после чега се разматрају раствори/емулзије у уљу (нпр. кукурузно уље), а тек после тога могуће растварање у осталим вехикулумима. За све вехикулуме, осим воде, морају бити позната токсична својства. Неопходно је утврдити стабилност испитиване супстанце у условима примене.

1.5. ПОСТУПАК

1.5.1. Број и пол животиња

Приликом испитивање сваке дозе употребљава се најмање осам животиња (четири женке и четири мужјака). Уколико се у међувремену планира лишавање живота на хуман начин, број је потребно повећати за број животиња чије се лишавање живота планира пре закључења испитивања. Број животиња на крају испитивања одговара за значајно вредновање токсичних ефеката. На основу претходног знања о супстанци или њеном блиском аналогу, потребно је узети у обзир укључивање додатне пратеће групе од осам животиња (четири по полу) у контролну групу и групу која прима највишу дозу, а због праћења пролазности (реверзибилности) или постојаности било ког од токсичних ефеката по истеку периода третирања. Трајање овога периода после третирања утврђује се у складу са опаженим ефектима.

1.5.2. Дозирање

Употребљава се најмање три нивоа дозе и истовремена контрола, осим у случајевима када се обавља испитивање граничне дозе (видети одељак 1.5.3. ове методе). Нивои дозе могу се заснивати на резултатима испитивања с поновљеном дозом или на резултатима испитивања намењеног утврђивању распона. Узимају се у обзир сви постојећи токсиколошки и токсикокинетички подаци који постоје за испитивано једињење или сродне материје. Осим уколико није ограничена физичком и хемијском природом или биолошким ефектима испитиване супстанце, највиша доза се бира са циљем да изазове токсичност, али не смрт или озбиљне тегобе. Опадајући низ доза бира се с намером да се докажу било какве реакције повезане са дозирањем, као и нивоа при коме се не опажају нежељени ефекти (NOAEL) при најнижој дози. Двоструки интервали, па све до четвороструких, најчешће су оптимални за успостављање силазних доза, док је додавање четврте експерименталне групе често препоручљивије од коришћења врло великих интервала између дозирања.

Контролна група је она која се не третира или контролна група која се третира само вехикулумом уколико се исти користи приликом давања испитиване супстанце. Изузев начина третирања испитиваном супстанцом, са животињама у контролној групи потребно је поступати на начин као и са експерименталним групама. Уколико се користи вехикулум,

контролна група добија вехикулум у највишој количини која се примењује. Уколико се испитивана супстанца даје заједно с храном и узрокује смањен унос хране тада, у разликовању смањеног уноса узрокованог укусом или токсиколошким променама код експерименталног модела, може бити од користи паралелно храњена контролна група.

Узимају се у обзир следећа својства вехикулума и осталих додатака, у зависности од случаја: деловање на апсорпцију, расподелу, метаболизам или задржавање испитиване супстанце; дејство на хемијска својства испитиване супстанце које може променити њена токсична својства и деловање на потрошњу хране и воде или стање ухрањености животиња.

1.5.3. Испитивање граничне дозе

Уколико приликом испитивања са једним нивоом дозе, која је најмање једнака нивоу од 1.000 mg/kg TM/дневно, у експерименту у коме се користе поступци описани за ово испитивање, не настану никакви штетни ефекти и уколико се токсичност не очекује на основу података о структурно сродним супстанцама, не сматра се неопходним целокупно испитивање које примењује три нивоа дозирања. Испитивање граничне дозе се не примењује само у случајевима када изложеност људи указује на потребу за применом веће дозе.

1.5.4. Примена доза

Испитивана супстанца се животињама даје свакодневно, седам дана недељно током периода од 90 дана. Било који други режим дозирања, на пример, пет дана недељно, потребно је оправдати. Када се испитивана супстанца примењује путем интубацијске цеви (присилно храњење), животињама које користе желудачну цев или одговарајућу интубациону канилу, потребно је дати у облику једне дозе. Максимална запремина течности која се може дати одједном зависи од величине експерименталне животиње. Неопходно је држати запремину на најнижем могућем нивоу. Изузев у случају иритабилних или корозивних супстанци код којих се обично лошији ефекти показују при вишим концентрацијама, варијабилност експерименталне запремине се своди на најмању могућу меру прилагођавањем концентрације, а како би се осигурала константна запремина при свим нивоима доза.

Код супстанце које се дају путем хране или воде за пиће важно је обезбедити да количине испитиване супстанце о којој је реч не ометају редовну исхрану и равнотежу воде. Кад се испитивана супстанца примењује храном, може се применити константна прехрамбена концентрација (ppm) или константна доза у односу на телесну масу животиње. Алтернатива која се користи се означава. У случају супстанце која се даје присилним храњењем (интубацијском цеви) или у облику капсула, дозу је потребно дати сваки дан у исто време и по потреби прилагодити како би се одржала константна доза у односу на телесну масу животиње. Кад се 90-дневно испитивање користи као прелиминарно испитивање дуготрајног испитивања хроничне токсичности, препоручљиво је у оба испитивања применити сличан начин исхране.

1.5.5. Опажања

Посматрање траје најмање 90 дана. Животиње у пратећој групи за које се планирају додатна праћења потребно је, одговарајуће време, држати без третмана, а како би се открила постојаност или опоравак од токсичних ефеката.

Општи клинички преглед се обавља најмање једном дневно, најбоље у исто време сваког дана, узимајући у обзир најзначајнији период у коме се очекује појава ефеката после дозирања. Неопходно је забележити клиничко стање животиња. Најмање двапут дневно, обично почетком и крајем сваког дана, све животиње се проверавају на симптоме морбидитета и морталитета.

Најмање једном пре првог излагања (како би се омогућило поређење код истих испитаника) и једном недељно после тога, потребно је детаљно клиничко праћење стања свих животиња. Наведена опажања, кад је то практично, потребно је обавити изван кавеза у којем животиња иначе борави, најбоље у стандардном окружењу и сваки пут у слично време. Неопходно је уложити одређени напор како би се гарантовало да су одступања у условима посматрања минимална. Симптоми токсичности пажљиво се региструју, укључујући време њиховог наступања, степен и трајање. Опажања обухватају, али нису ограничена на: промене на кожи, крзну, очима, мукозним мембранама, настанак секреција и излучевина и аутономну активност (нпр. сужење, пилоерекција – подизање длаке, величина зеница, необична респираторна структура). Потребно је регистровати и промене у ходу, држању и реакцији на манипулисање, као и постојање клоничких или тоничких покрета и шаблона у понашању (нпр. претерано неговање спољашности, поновљено кружење) или необично понашање.

Офталмолошки преглед, коришћењем офталмоскопа или одговарајуће опреме, обавља се пре давања испитиване супстанце и после завршетка испитивања, најбоље код свих животиња или бар у групама које примају високу дозу и у контролним групама. Уколико се примете промене на очима, неопходан је преглед свих животиња.

1.5.5.1. Телесна маса и потрошња хране/воде

Све животиње се мере најмање једном недељно. Мерење потрошње хране обавља се најмање једном недељно. Уколико се испитивана супстанца даје заједно са водом за пиће, мери се и потрошња воде, и то најмање на недељном нивоу. Потрошња воде може да се узме у обзир и у испитивањима која се односе на исхрану или присилно храњење током којих може доћи до промене у активности узимања течности.

1.5.5.2. Хематологија и медицинска биохемија

Узорке крви потребно је узети са наведеног места и чувати у одговарајућим условима, у зависности од конкретног случаја. На крају периода испитивања узорци се прикупљају непосредно пре или приликом поступка лишавања животиња живота на хуман начин.

На почетку испитивања, затим у месечним интервалима или на средини испитивања и на крају испитивања, обавезно је хематолошко испитивање, укључујући, хематокрит, концентрацију хемоглобина, број еритроцита, укупни и диференцијални број леукоцита, број тромбоцита и мерење потенцијала згрушавања, попут времена згрушавања, протромбинског времена

или тромбопластинског времена.

Одређивања из подручја медицинске биохемије с циљем истраживања значајнијих токсичних ефеката у ткивима, односно ефекта на бубреге и јетру, потребно је обавити на узорцима крви добијеним од сваке животиње на почетку, затим у месечним интервалима или на средини испитивања и на крају испитивања. Подручја испитивања која је потребно узети у обзир обухватају равнотежу електролита, метаболизам угљених хидрата и функцију јетре и бубрега. На избор специфичних испитивања утичу запажања о начину деловања испитиване супстанце. Препоручује се гладовање код животиња пре узимања узорака крви током временског периода које одговара појединој животињској врсти. Препоручена одређивања обухватају утврђивање: нивоа калцијума, фосфора, хлорида, натријума, калијума, вредности глукозе на празан желудац, аланин аминотрансферазе, аспартат аминотрансферазе, орнитин декарбоксилазе, гама глутамил транспептидазе, азота из урее, албумина, креатинина у крви и мерење укупног билирубина и укупних протеина у серуму.

Анализе мокраће потребно је извести најмање на почетку, затим на средини и на крају испитивања, прикупљањем запремине мокраће у одговарајућем временском периоду. Анализа мокраће обухвата изглед, волумен, осмолалност и специфичну тежину, pH, протеине, глукозу и крв/крвне ћелије. Могу се применити и додатни параметри у случајевима кад је потребно проширити испитивање примећених ефеката.

Потребно је размотрити и испитивања намењена истраживању серумских маркера општих ткивних оштећења. Остала опажања која могу бити потребна због доношења одговарајуће токсиколошке оцене обухватају: анализу липида, хормона, ацидо-базне равнотеже, метхемоглобина и инхибиције холинестеразе.

Допуштено је додатно користити анализе медицинске биохемије када је потребно проширити испитивање запажених ефеката. Наведене ефекте је потребно идентификовати код хемикалија које припадају одређеним категоријама опасности или у зависности од конкретног случаја.

Потребан је флексибилан приступ, у зависности од животињске врсте и запажених односно очекиваних ефеката испитиване супстанце.

1.5.5.3. Постмортални преглед (макро-некропсија)

Све животиње обухваћене испитивањем подвргавају се детаљном постморталном прегледу који укључује пажљив преглед спољње површине тела, свих телесних отвора и кранијалне, торакалне и абдоминалне шупљине и њихових садржаја. Са јетре са жучном кесицом, бубрега, надбубрежне жлезде, тестиса, епидидимиса, оваријума, утеруса, штитне жлезде (са паратироидним жлездама), грудне жлезде, слезине, мозга и срца сваке животиње (осим животиња које су затечене на умирању и/или су лишене живота на хуман начин) потребно је одстранити сва припадајућа ткива, у зависности од случаја, измерити њихову тежину у влажном стању што је пре могуће после дисекције како би се избегло исушивање.

У медијуму фиксације који је најприкладнији с обзиром на врсту ткива и хистопатолошко испитивање које следи потребно је сачувати следећа ткива: све макро лезије, мозак (репрезентативна подручја, укључујући велики мозак, мали мозак и медулу/мост), кичмену мождину (на три нивоа: цервикалној регији, средини торакалне регије и лумбалној регији), хипофизу, очи, штитну жлезду, паратироидну жлезду, грудну жлезду, једњак, пљувачне жлезде, желудац, танко и дебело црево (укључујући Peyerove плоче), јетру, жучну кесу, панкреас, бубреге, надбубрежне жлезде, слезину, срце, душник и плућа, аорту, полне жлезде, утерус, помоћне полне органе, женске млечне жлезде, простату, мокраћну бешику, лимфне жлезде (најбоље једна лимфна жлезда која покрива пут примене супстанце и друга која је удаљена од пута којим се супстанца примењује како би се њоме обухватили системски ефекти), периферне живце (исхијатични или тибијални живац) најбоље у близини мишића, узорак коштане сржи (и/или свежи аспират коштане сржи) и кожу. Клинички и остали налази могу да укажу на потребу испитивања додатних ткива. Потребно је сачувати и све органе за које постоји вероватноћа да су циљни органи, а на основу познатих својстава испитиване супстанце.

1.5.5.4. Хистопатологија

Потребно је обавити целовиту хистопатологију на сачуваним органима и ткивима, бар свих животиња у контролним групама и групама које су примале високе дозе. Наведеним испитивањима обухватају се животиње свих осталих група дозирања, а уколико код групе која је примала високу дозу буду примећене промене везане за третман.

Испитују се све макро-лезије.

Ако се користи пратећа група, хистопатологија се обавља на ткивима и органима за која је закључено да се на њима показују ефекти у третираним групама.

2. ПОДАЦИ

Неопходно је навести податке који се односе на појединачне животиње. Подаци се наводе табеларно и приказују: број животиња на почетку испитивања у свакој експерименталној групи, број животиња које су пронађене мртве током испитивања или су лишене живота из хуманих разлога, као и време сваке смрти или лишавања живота на хуман начин, број животиња код којих су се појавили симптоми токсичности, опис запажених симптома токсичности, укључујући време њиховог наступања, трајање и озбиљност сваког токсичног ефекта, број животиња код којих су се јавиле лезије, врста лезија и проценат животиња код којих се појавила свака појединa врста лезија.

Када је могуће, нумерички резултати се процењују помоћу одговарајуће и општеприхваћене статистичке методе. Статистичке методе и подаци који се анализирају бирају се током осмишљавања испитивања.

3. ИЗВЕШТАЈ

Извештај о испитивању садржи податке о:

1) Испитиваној супстанци:

– физичка својства, чистоћа и физичка и хемијска својства;

– подаци за идентификацију;

– вехикулум (уколико одговара): разлози за избор вехикулума, уколико није реч о води.

2) Експерименталној животињској врсти:

– употребљена врста и сој;

– број, старост и пол животиња;

– порекло, услови смештаја, исхрана, итд.;

– појединачна телесна маса животиња на почетку испитивања.

3) Условима испитивања:

– логичка основа за избор нивоа дозе;

– детаљи о припремању испитиване супстанце/припремању хране, постигнута концентрација, стабилност и хомогеност препарата;

– детаљи о начину примене испитиване супстанце на животињама;

– стварне дозе (mg/kg ТМ/дневно) и фактор прерачунавања концентрације испитиване супстанце у храни/води за пиће (ppm) у стварну дозу, уколико је примењиво на конкретан случај;

– детаљи о квалитету хране и воде.

4) Резултатима:

– телесна маса и промене у телесној маси;

– потрошња хране и воде, ако је битно;

– подаци о токсичном ефекту по полу и нивоу дозе, укључујући симптоме токсичности;

– својства, тачност и трајање клиничких посматрања (било у случају реверзибилних, било иреверзибилних ефеката);

– офталмолошки преглед;

– хематолошка испитивања с релевантним основним вредностима;

– медицинско-биохемијска испитивања са релевантним основним вредностима;

– телесна маса по лишавању живота на хуман начин, тежине органа и односи тежине органа/ТМ;

– обдукциони налази;

– детаљан опис свих хистопатолошких налаза;

– подаци о апсорпцији уколико постоје;

– статистичка обрада резултата, када одговара.

5) Образложењу резултата.

6) Закључцима.

B.28. СУБХРОНИЧНА ДЕРМАЛНА ТОКСИЧНОСТ – СТУДИЈА ПОНОВЉЕНИХ ДЕРМАЛНИХ ДОЗА НА ГЛОДАРИМА, 90 ДАНА

1. МЕТОДА ИСПИТИВАЊА

1.1. УВОД

Видети Општи увод.

1.2. ДЕФИНИЦИЈЕ

Видети Општи увод.

1.3. РЕФЕРЕНТНЕ СУПСТАНЦЕ

Нису прописане.

1.4. ПРИНЦИП МЕТОДЕ

Испитивана супстанца се свакодневно и у прогресивним дозама наноси на кожу неколико група експерименталних

животиња и то једна доза по групи током 90 дана. Током периода примене животиње се свакодневно посматрају због уочавања симптома токсичности. На животињама које угину током испитивања обавља се постмортални преглед, док се, по закључењу испитивања, преживеле животиње такође лишавају живота на хуман начин и постмортално прегледају.

1.5. КРИТЕРИЈУМИ КВАЛИТЕТА

Нису прописани.

1.6. ОПИС МЕТОДЕ

1.6.1. Припрема

Животиње се држе у условима експерименталног смештаја и исхране током најмање пет дана пре испитивања. Пре испитивања, здраве и младе животиње се случајним избором бирају и додељују третираним и контролним групама. С леђног дела трупа експерименталних животиња непосредно пре испитивања ошиша се крзно. Могуће је бријање, али је потребно обавити га око 24 сата пре испитивања. Шишање или бријање обично је потребно поновити сваке недеље. Приликом шишања или бријања крзна не треба оштетити кожу. За примену супстанце која се испитује потребно је уклонити крзно с најмање 10% површине тела. Приликом одлучивања о величини површине тела са које је потребно уклонити крзно и о димензијама прекривања супстанцом која се испитује узима се у обзир телесна маса животиње. Кад се испитују чврсте супстанце, које се, уколико одговара, могу и пулверизовати, супстанцу која се испитује потребно је довољно навлажити водом или, када је неопходно, одговарајућим вехикулумом, како би се обезбедио квалитетан контакт с кожом. Течне супстанце које се испитују обично се користе неразблажене. Примењује се режим свакодневне примене током периода од пет до седам дана недељно.

1.6.2. Услови испитивања

1.6.2.1. Експерименталне животиње

Употребљавају се одрасли пацови, зечеви или заморци. Могу се употребити и остале животињске врсте, с тим да је потребно да њихова примена буде оправдана. Приликом започињања испитивања распон одступања у телесној маси треба да буде ± 20% просечне телесне масе. Када се испитивање субхроничне дермалне токсичности обавља као прелиминарно, пре дуготрајног испитивања, у оба испитивања се употребљавају животиње исте врсте и истог соја.

1.6.2.2. Број и пол

Приликом испитивања сваког нивоа дозе употребљава се најмање 20 животиња (десет женки и десет мужјака) здраве коже. Бирају се женке које нису раније рађале и које нису гравидне. Уколико се у међувремену планира лишавање живота на хуман начин, број је потребно повећати за број животиња чије се лишавање живота планира пре закључења испитивања. Може да се укључи и пратећа група од 20 животиња (10 по полу) код којих се примењује висок дозни ниво током 90 дана и прати пролазност (реверзибилност), постојаност или одложена појава токсичних ефеката током периода од 28 дана по истеку периода третирања.

1.6.2.3. Дозни нивои

Употребљава се најмање три нивоа дозе на контролном узорку и узорку намењеном контроли вехикулума, уколико се примењује вехикулум. Време излагања је најмање шест сати дневно. Експериментална супстанца се примењује у исто време сваког дана, а количина супстанце која се примењује периодично се прилагођава (недељно или двонедељно) с циљем одржавања константног нивоа дозе с обзиром на телесну масу животиње. Изузев третирања испитиваном супстанцом, са животињама у контролној групи поступа се на исти начин као с испитаницима у експерименталним групама. Када се због лакшег дозирања користи вехикулум, контролна група намењена контроли вехикулума дозира се на исти начин као и третиране групе и прима количину вехикулума једнаку оној коју прима група с највишим нивоом дозе. Највиши дозни ниво треба да доведе до токсичних ефеката, док смртних последица не треба да буде или њихов број треба да буде занемарљив. Најнижи дозни ниво не сме да произведе било какве доказе токсичности. У ситуацијама кад постоји примењива процена нивоа изложености људи испитиваној супстанци, најнижи дозни ниво треба да премашује наведени ниво. У идеалном случају, средњи дозни ниво треба да доведе до минималних видљивих токсичних ефеката. Уколико се користи више од једне средње дозе, дозни нивои треба да буду распоређени на начин који за последицу има градацију токсичних ефеката. У нижим средњим групама, као и у контролним групама, инциденца смртних последица треба да буде ниска, како би се омогућила правилна процена резултата.

Уколико примена супстанце која се испитује за последицу има озбиљну иритацију коже, потребно је смањити концентрацију, што може довести до смањења или нејављања осталих токсичних ефеката при највишем нивоу дозе. Уколико је кожа тешко оштећена може да буде неопходно да се прекине испитивање и да се организује ново испитивање уз коришћење нижих концентрација.

1.6.2.4. Испитивање граничне дозе

Уколико приликом прелиминарног испитивања са нивоом дозе од 1.000 mg/kg или вишом дозом која је повезана с могућом изложености људи када је иста позната, не настану никакви токсични ефекти, даље испитивање се можда неће сматрати неопходним.

1.6.2.5. Период посматрања

Експерименталне животиње се свакодневно посматрају да би се уочили симптоми токсичности. Неопходно је забележити време смрти и време у које су се појавили или нестали симптоми токсичности.

1.6.3. Поступак

Животиње се појединачно смештају у кавезе. У идеалном случају животиње се испитиваном супстанцом третирају седам дана недељно, током периода од 90 дана.

Животиње у било којој пратећој групи, за које је планирано накнадно посматрање после завршетка испитивања, држе се без третмана наредних 28 дана како би се открио опоравак од или постојаност токсичних ефеката. Време излагања је шест сати дневно.

Испитивана супстанца се равномерно наноси на подручје чија величина износи око 10% укупне површине тела. Кад су у питању високо токсичне супстанце, површинско подручје које се прекрива може бити мање, али је потребно што више наведеног подручја прекрити што тањим и равномернијим слојем.

Током излагања испитивана супстанца се одржава у контакту с кожом помоћу порозног завоја од газе и самолепиве траке која не надражује кожу. Подручје коже на којем се испитивање обавља се, на одговарајући начин, додатно прекрива, како би се сачувао повој и испитивана супстанца и како би се обезбедило да животиње не могу да прогутају испитивану супстанцу. Дозвољено је делимично имобилисати животиње како би се спречило гутање испитиване супстанце, али се не препоручује потпуна имобилизација.

По истеку периода излагања потребно је, кад је могуће, уклонити остатке испитиване супстанце коришћењем воде или неке друге одговарајуће методе чишћења коже.

Све животиње се свакодневно прате и бележе се симптоми токсичности, укључујући време њиховог наступања, степен и трајање. Опажања током боравка животиња у кавезима обухватају: промене на кожи и крзну, очима, мукозним мембранама, као и праћење респираторног, циркулаторног, аутономног и централног нервног система и соматомоторне активности и образаца понашања. Потребно је мерити конзумирање хране и телесну масу животиња на недељном нивоу. Неопходно је редовно посматрање животиња како би се обезбедило да не дође до губитка животиња због канибализма, аутолизе ткива или погрешног смештања. По завршетку испитивања на свим преживелим испитаницима у не-пратећим третираним групама обавља се постмортални преглед. Животиње на самрти потребно је уклонити и обдуковати.

На свим животињама, укључујући контролне, обично се обављају следећа испитивања:

а) Офталмолошки преглед, коришћењем офталмоскопа или подједнако погодне опреме потребно је обавити пре излагања испитиваној супстанци и по завршетку испитивања, најбоље код свих животиња, али бар у групама које примају високу дозу и контролним групама. Уколико се запазе промене на очима, неопходан је преглед свих животиња.

б) Хематолошка испитивања, која укључују хематокрит, концентрацију хемоглобина, број еритроцита, укупни и диференцијални број леукоцита и процену потенцијала згрушавања, као што је време згрушавања, протромбинско време или тромбопластинско време или броја тромбоцита потребно је обавити на крају периода испитивања.

в) Одређивања у области медицинске биохемије потребно је обавити на крају периода испитивања. Области које се сматрају одговарајућим за сва испитивања обухватају равнотежу електролита, метаболизам угљених хидрата и функцију јетре и бубрега. На избор специфичних испитивања утичу опажања о начину деловања супстанце. Предлаже се утврђивање нивоа калцијума, фосфора, хлорида, натријума, калијума, глукозе на празан желудац (уз примену периода гладовања које је одговарајуће за одређену животињску врсту), серумске глутамат пируват трансаминазе[III], серумске глутамат оксалоацетат трансаминазе[IV], орнитин декарбоксилазе, гама глутамил транспептидазе, азота из урее, албумина, креатинина у крви, укупног билирубина и укупних протеина у серуму.

Остали налази који могу бити потребни због одговарајуће токсиколошке процене обухватају: анализу липида, хормона, ацидно-базне равнотеже, метхемоглобина и активности холинестеразе. Може се применити додатна медицинска биохемија када је то потребно због проширивања истраживања запажених ефеката.

г) Преглед урина није део уобичајене праксе, него се тражи тек онда када за то постоји индикација на основу очекиване или запажене токсичности.

Уколико основни подаци претходних истраживања не одговарају, потребно је размотрити да ли је неопходно да се пре почетка дозирања утврде параметри хематологије и клиничке биохемије.

_____

III Сада познат као серумска аланин аминотрансфераза.

IV Сада познат као серумска аспартат аминотрансфераза

1.6.3.1. Постмортални преглед (макро-некропсија)

Све животиње обухваћене испитивањем подвргавају се детаљном постморталном прегледу који укључује преглед спољне површине тела, свих телесних отвора и кранијалне, торакалне и абдоминалне шупљине и њихових садржаја. Јетра, бубрези, надбубрежне жлезде и тестиси се мере што је пре могуће после дисекције како би се избегло исушивање.

У одговарајућем медијуму због могућег каснијег хистопатолошког испитивања потребно је сачувати следеће органе и ткива: све макро лезије, мозак – укључујући делове медуле/понса, коре малог мозга и мождане коре, хипофизу, штитину/штитасту жлезду и ткиво грудне жлезде, (душник), плућа, срце, аорту, пљувачне жлезде, јетру, слезину, бубреге, надбубрежне жлезде, панкреас, полне жлезде, утерус, помоћне полне органе, жучну кесу (уколико постоји), једњак, желудац, дуоденум,

танко црево, слепо црево, дебело црево, мокраћну бешику, репрезентативни лимфни чвор (женска млечна жлезда), (мускулатуру бедра), периферни живац, (очи), (грудну кост с коштаном сржи), (бедрену кост – укључујући површину зглоба), (кичмену мождину на три нивоа-цервикални, средњеторакални и лумбални) и (ексорбиталне сузне жлезде). Ткива наведена у заградама прегледају се само уколико на то указују симптоми токсичности или ако су у питању циљни органи.

1.6.3.2. Хистопатолошки преглед

а) Детаљну хистопатологију неопходно је обавити на нормалној и третираној кожи и на органима и ткивима животиња у контролним групама и групама које су третиране високим дозама.

б) Неопходан је преглед свих макро-лезија.

в) Прегледају се циљни органи у групама које су примале остале дозе.

г) Када се користе пацови, плућа животиња у групама третираним ниским и средњим дозама се подвргавају хистопатолошком прегледу због проналажења доказа о инфекцији, с обзиром да се тиме долази до правилне оцене здравственог стања животиња. Може се десити да се даљи хистопатолошки прегледи не обављају рутински на животињама у наведеним групама, али се увек спроводе на органима на којима постоје докази лезија у високо дозираној групи.

д) Ако се користи пратећа група, хистопатологија се обавља на ткивима и органима за које је утврђено да се на њима показују ефекти у осталим третираним групама.

2. ПОДАЦИ

Подаци се наводе табеларно и приказују: број животиња на почетку испитивања у свакој експерименталној групи, број животиња код којих су се појавиле лезије, врсту лезија и проценат животиња код којих се појавила свака поједина врста лезија.

Резултати се процењују помоћу одговарајуће статистичке методе и може се применити било која призната статистичка метода.

3. ИЗВЕШТАЈ

3.1. ИЗВЕШТАЈ О ИСПИТИВАЊУ

Извештај о испитивању, уколико је могуће, садржи податке о:

– животињској врсти, сојуу, пореклу, условима околине, исхрани;

– условима испитивања;

– нивоима доза (укључујући вехикулум уколико се користи) и концентрације;

– токсичном ефекту према полу и дози;

– нивоу на коме нису опажени било какви ефекти, када је то могуће;

– времену смрти током испитивања или податке да ли су животиње преживеле до усмрћења;

– опису токсичних и осталих ефеката;

– времену запажања сваког патолошког знака и његов каснији ток;

– храни и телесној маси;

– офталмолошким налазима;

– примењеним хематолошким испитивањима и свим резултатима;

– примењеним испитивањима медицинске биохемије и свим резултатима (укључујући резултате сваког прегледа мокраће);

– налазима обдукције;

– детаљном опису свих хистопатолошких налаза;

– статистичкој обради резултата када је могуће;

– образложењу резултата;

– тумачењу резултата.

3.2. ПРОЦЕНА И ТУМАЧЕЊЕ РЕЗУЛТАТА

Видети Општи увод.

4. ЛИТЕРАТУРА

Видети Општи увод.

B.29. СУБХРОНИЧНА ИНХАЛАЦИОНА ТОКСИЧНОСТ – СТУДИЈА ПОНОВЉЕНИХ ИНХАЛАЦИОНИХ ДОЗА НА ГЛОДАРИМА, 90 ДАНА

1. МЕТОДА ИСПИТИВАЊА

1.1. УВОД

Видети Општи увод.

1.2. ДЕФИНИЦИЈЕ

Видети Општи увод.

1.3. РЕФЕРЕНТНЕ СУПСТАНЦЕ

Нису прописане.

1.4. ПРИНЦИП МЕТОДЕ

Неколико група експерименталних животиња излаже се одређено време свакодневно супстанци која се испитује у растућим концентрацијама, при чему се на једну групу примењује једна концентрација у трајању од 90 дана. Када се користи помоћно средство да би се добиле одговарајуће концентрације испитиване супстанце у атмосфери, користи се и контролна група. За време примене, животиње се свакодневно посматрају због откривања знакова токсичности. Животиње које за време испитивања угину постмортално се прегледају, а по завршетку испитивања и преживеле животиње се постмортално прегледају.

1.5. КРИТЕРИЈУМИ КВАЛИТЕТА

Нису прописани.

1.6. ОПИС МЕТОДЕ

1.6.1. Припреме

Животиње се држе и хране под експерименталним условима најмање пет дана пре испитивања. Пре испитивања, здраве младе животиње се насумце издвајају и додељују групама које се третирају и контролним групама. Где је потребно, испитиваној супстанци може се додати помоћно средство да би се припремиле одговарајуће концентрације супстанце у атмосфери. Ако се помоћно средство или други додаци користе за олакшавање дозирања мора бити познато да не производе токсичне ефекте. Уколико одговара, користе се подаци из раније студије.

1.6.2. Услови испитивања

1.6.2.1. Експериментална животиње

Уколико не постоје контраиндикације, користе се пацови. Узимају се лабораторијске врсте младих здравих животиња које се уобичајено користе. На почетку студије, распон промена у телесној маси коришћених животиња не сме да прелази ± 20% одговарајуће средње вредности. Ако се води студија субхроничне инхалације као увод у дугорочну студију, у обе студије користе се исте врсте.

1.6.2.2. Број и пол

За сваку концентрацију излагања користи се најмање 20 животиња (10 женки и 10 мужјака). Узимају се женке које нису раније рађале и које нису гравидне. Ако се планирају лишавања живота на хуман начин у току експеримента, број се повећава за број животиња које су планиране за лишавање живота пре завршетка студије. Пратећа група од 20 животиња (10 животиња по полу) излаже се у трајању од десет дана високој концентрацији и посматра, како би се регистровала реверзибилност, постојаност или закаснела појава токсичних ефеката 28 дана по завршетку третмана.

1.6.2.3. Концентрације

Ако се користи помоћно средство, потребне су најмање три концентрације, с контролом или контролом помоћног средства (које одговара концентрацији помоћног средства на највишем нивоу). Осим третмана експерименталном супстанцом, према животињама у контролној групи се поступа на исти начин као с онима у експерименталној групи. Највише концентрације показују токсичне ефекте, али ни један смртни случај или само неколико смртних случајева. Ако постоји примењлива процена изложености људи, најнижи ниво примењен на животињама премашује ту вредност. У идеалном случају, средња концентрација производи минимално приметне токсичне ефекте. Ако се користи више од једне средње концентрације, њихове вредности су довољно различите да се постигне градација токсичних ефеката. У групама код којих су примењене ниске или средње концентрације, као и контролним групама, учесталост смртних случајева код животиња је ниска, како би процена резултата имала смисла.

1.6.2.4. Време излагања

Дневно време излагања је шест сати после изједначавања концентрација у коморама, али се могу одредити и други временски интервали када постоје посебни захтеви.

1.6.2.5. Опрема

Животиње се подвргавају испитивању у инхалационој опреми која је дизајнирана тако да одржава константни проток

ваздуха с најмање 12 потпуних измена у једном сату, како би се обезбедила одговарајућа концентрација кисеоника и равномерно распоређена атмосфера експозиције. Тамо где се користи комора, њен дизајн је довољно пространа да минимализује пренасељеност животиња и максимализује њихову изложеност испитиваној супстанци удисањем. Као опште правило које обезбеђује стабилност атмосфере у комори, користи се мера, према којој укупна запремина експерименталних животиња не сме да прелази 5% запремине коморе. Могу се користити различити типови комора који омогућавају изложеност само оро-назалних отвора, главе или читавог тела, при чему прве две смањују преузимање испитиване супстанце другим путевима.

1.6.2.6. Време посматрања

Експерименталне животиње посматрају се сваког дана током периода третирања као и за време опоравка како би се уочили знакови токсичности. Важно је регистровати време кад се јаве или нестану први знакови тровања, као и време смрти.

1.6.3. Поступак

Животиње се излажу испитиваној супстанци сваког дана, пет до седам дана недељно, у периоду од 90 дана. Животиње из пратећих група које су предвиђене за каснија посматрања, држе се још 20 дана без третмана, како би се утврдила постојаност токсичних ефеката или опоравак од истих. Температура на којој се обавља испитивање се одржава на 22° C ± 3° C. У идеалним условима, релативна влажност је између 30% и 70%, али у неким случајевима (нпр. испитивања аеросола) то није изводљиво. За време излагања, животињама се не даје вода и храна.

Током експеримента користи се динамички инхалациони систем с одговарајућим системом аналитичке контроле концентрације. Како би се успоставиле одговарајуће концентрације препоручује се обављање пробног испитивања. Проток ваздуха се подешава тако да се обезбеди хомогеност услова у комори. Систем омогућава да се стабилни услови излагања постижу што је могуће брже.

Обављају се мерења и прате следећи параметри:

а) брзина протока ваздуха (непрекидно);

б) концентрација испитиване супстанце мерена у подручју удисања. За време излагања у току једног дана концентрација испитиване супстанце не сме да варира више од ± 15% од средње вредности. Код прашине и аеросола, можда није могуће постићи тај ниво контроле па се толерише шири опсег вредности. За време трајања читавог експеримента, концентрације се из дана у дан држе константним колико год је изводљиво. За време развоја система врше се анализе величина честица да би се утврдила стабилност концентрација аеросола. Током излагања, анализе се обављају у временским интервалима у којима је то неопходно за одређивање конзистенције расподеле величина честица;

в) температура и влажност;

г) за време и после излагања, опажања се систематично региструју; за сваку животињу води се посебан записник.

Животиње се посматрају свакодневно, а знакови токсичности се евидентирају, укључујући време њиховог првог јављања, степен и трајање. Региструју се промене на кожи и крзну, очима, слузницама, респираторном, циркулаторном, аутономном и централном нервном систему, као и соматомоторна активност и начин понашања. Једном недељно мере се телесна маса животиња и унос хране. Потребно је редовно пратити животиње да би се избегао њихов губитак због канибализма, аутолизе ткива или друго. На крају периода излагања обавља се постмортални преглед свих преживелих животиња. Животиње које су на самрти издвајају се и постмортално прегледају, кад се примети да су јако слабе.

На свим животињама, укључујући и оне из контролне групе, обично се раде следећа испитивања:

а) офталмолошки преглед уз коришћење офталмоскопа или сличног одговарајућег инструмента врши се пре излагања испитиваној супстанци и на крају студије, обично на свим животињама или бар на онима које су биле изложене високој дози и животињама у контролним групама. Ако се открију промене на очима, потребно је прегледати све животиње;

б) хематолошке анализе, укључујући хематокрит, концентрацију хемоглобина, број еритроцита, укупан и диференцијални број леукоцита и потенцијал згрушавања крви као што је: време згрушавања, протромбинско време, тромбопластинско време или број тромбоцита, врше се на крају периода испитивања;

в) медицинско биохемијска одређивања у крви обављају се на крају периода испитивања. Подручја испитивања која се сматрају важним за све студије су: равнотежа електролита, метаболизам угљених хидрата, функција јетре и бубрега. На избор специфичних испитивања утичу посматрања механизма деловања супстанце. Предложена одређивања су: калцијум, фосфор, хлорид, натријум, калијум, глукоза у условима гладовања (с временом гладовања које је одговарајуће за врсту), серумска глутамат пируват трансаминаза[V], серумска глутамат оксалоацетат трансаминаза[VI], орнитин дексарбоксилаза, гама глутамил транспептидаза, азот у уреји, албумин, креатинин у крви, укупни билирубин и мерења укупних протеина у серуму. Друга одређивања која могу да буду потребна за адекватну токсиколошку процену обухватају: анализе липида, хормона, ацидобазну равнотежу, метхемоглобин и активност холинестеразе. Додатне биохемијске анализе могу се укључити када је потребно проширити испитивање посматраних ефеката;

г) анализа урина није рутински потребна, само ако постоји индикација заснована на очекиваној или примећеној токсичности.

Ако су основни подаци из раније студије недовољни, разматра се одређивање хематолошких и медицинско биохемијских параметара пре почетка дозирања.

_____

V Сада позната као серумска аланин аминотрансфераза.

VI Сада позната као серумска аспартат аминотрансфераза.

1.6.3.1. Постмортални преглед

Све животиње подвргавају се детаљном постморталном прегледу који обухвата преглед спољне површине тела, свих отвора, лобањске, грудне и трбушне шупљине и њихових садржаја. Одмах после секције, још мокри, мере се следећи органи: јетра, бубрези, жлезде и тестиси. Мерење се спроводи што пре после секције, да се органи не би осушили. У прикладном медијуму за евентуални будући хистопатолошки преглед чувају се следећи органи и ткива: све велике лезије, плућа – која се ваде интактна, мере се и третирају одговарајућим фиксативом како би се очувале све структуре органа (перфузија с фиксативом сматра се ефикасном процедуром), назофарингеално ткиво, мозак – укључујући делове мождине/понс, коре малог мозга(церебеларни кортекс) и мождане коре (церебрални кортекс), хипофизно, тироидно/паратироидни и било које тимусно ткиво, душник, плућа, срце, аорта, пљувачне жлезде, јетра, слезина, бубрези, надбубрежне жлезде, гуштерача, гонаде, материца (припадајући генитални органи), (кожа), жучна кесица (ако постоји), једњак, желудац, дванаестопалачно црево, танко црево, слепо црево, дебело црево, ректум, мокраћна бешика, лимфни чворови (женске млечне жлезде), (бедрена мускулатура), периферни живци, (очи), грудна кост са коштаном сржи (фемур, укључујући зглобне површине) и (кичмена мождина у три нивоа – цервикални, средњеторакални и лумбални). Ткива наведена у заградама прегледају се само ако постоје знаци токсичности или ако се ради о циљном органу.

1.6.3.2. Хистопатолошка испитивања

а) Комплетна хистопатолошка посматрања обављају се на респираторном тракту и другим органима и ткивима свих животиња у контролним групама и групама које су биле изложене високим концентрацијама.

б) Све велике лезије се прегледају.

в) Прегледају се циљни органи у групама које су подвргнуте другим концентрацијама.

г) Хистопатолошки се прегледају и плућа животиња које су подвргнуте ниским и средњим концентрацијама, јер се на тај начин може објективно утврдити здравствено стање животиња. Даљи хистопатолошки прегледи рутински се не обављају на животињама у тим групама, али се увек обављају на органима на којима су видљиве лезије у групи подвргнутој високој концентрацији.

д) Кад се користи пратећа група, хистопатолошки се обрађују ткива и органи који показују исте ефекте као и код животиња из других испитаних група.

2. ПОДАЦИ

Подаци се наводе табеларно, где се за сваку испитивану групу животиња наводи број животиња на почетку експеримента, број животиња с лезијама, врсте лезија и проценат животиња код којих су пронађене лезије. Резултати се процењују одговарајућом статистичком методом. Може се користити било која усвојена статистичка метода.

3. ИЗВЕШТАЈ

3.1. ИЗВЕШТАЈ О ИСПИТИВАЊУ

Извештај о испитивању, ако је могуће, садржи податке о:

– врсти, варијетету, извору, условима околине, исхране;

– експерименталним условима: опис апаратуре за излагање, укључујући дизајн, тип, димензије, извор ваздуха, систем за распршивање аеросола, метода кондиционирања ваздуха, обрада искоришћеног ваздуха и начин чувања животиња у комори. Потребно је описати и апаратуру за мерење температуре, влажности и када одговара, стабилност концентрација аеросола или величина честица;

– излагању испитиваној супстанци који се приказују табеларно заједно са средњим вредностима и мером одступања (нпр. стандардна девијација) и обухватају:

а) брзину протока ваздуха кроз инхалациону опрему;

б) температуру и влажност ваздуха;

в) номиналну концентрацију (укупан садржај испитиване супстанце која се уводи кроз инхалациону опрему, подељена са запремином ваздуха);

г) природу помоћног средства, ако се користило;

д) тачне концентрације супстанце у зони удисања;

ђ) средње величине честица (када је потребно);

– токсичним ефектима по полу и концентрацији;

– нивоу без ефекта ако је могуће;

– времену смрти у току експеримента или да ли су животиње преживеле до краја експеримента;

– опису токсичних или других ефеката;

– времену посматрања било каквих абнормалности и њихов каснији ток;

– храњењу и телесној маси;

– офталмолошким налазима;

– хематолошким испитивањима која су примењена и налазима;

– медицинско-биохемијским испитивањима и налазима (укључивши налазе анализе урина);

– налазима обдукције;

– детаљном опису свих хистопатолошких налаза;

– статистичкој обради резултата где је могуће;

– образложењу резултата;

– тумачењу резултата.

3.2. ПРОЦЕНА И ТУМАЧЕЊЕ РЕЗУЛТАТА

Видети Општи увод.

4. ЛИТЕРАТУРА

Видети Општи увод.

B.30. ИСПИТИВАЊЕ ХРОНИЧНЕ ТОКСИЧНОСТИ

1. МЕТОДА ИСПИТИВАЊА

1.1. УВОД

Видети Општи увод.

1.2. ДЕФИНИЦИЈЕ

Видети Општи увод.

1.3. РЕФЕРЕНТНЕ СУПСТАНЦЕ

Нису прописане.

1.4. ПРИНЦИП МЕТОДЕ

Испитивана супстанца се обично примењује седам дана недељно, одговарајућим путем, код неколико група експерименталних животиња, једна доза по групи, кроз дужи период њиховог животног века. За време и после изложености испитиваној супстанци, експерименталне животиње се посматрају свакодневно, како би се открили знаци токсичности.

1.5. КРИТЕРИЈУМИ КВАЛИТЕТА

Нису прописани.

1.6. ОПИС МЕТОДЕ

1.6.1. Припреме

Животиње се држе под експерименталним условима чувања и храњења најмање пет дана пре испитивања. Пре испитивања случајним избором здраве младе животиње се сврставају у третиране и контролне групе.

1.6.2. Услови испитивања

1.6.2.1. Експериментална животиње

Препоручена врста је пацов. Могу се користити и друге врсте (глодара или других животиња), на основу резултата претходних студија. Испитивању се подвргавају здрави млади примерци животиња оних лабораторијских врста које се најчешће користе у оваквим експериментима, а примена дозе започиње у што краћем временском року после одбијања од сисе.

На почетку студије варијације у телесној маси коришћених животиња не смеју прелазити ± 20% средње вредности. Ако се изводи субхронична орална студија као увод у дугорочну студију, у обе студије користе се исте врсте и варијетети.

1.6.2.2. Број и пол

За сваки дозни ниво и истовремену контролну групу користи се најмање 40 животиња (20 женки и 20 мужјака). Узимају

се женке које никад нису рађале и које нису гравидне. Ако се планирају лишавања живота на хуман начин у току експеримента, број се повећава за број животиња које су планиране за лишавање живота пре завршетка студије.

За врсте које не припадају глодарима прихватљив је мањи број животиња, али најмање четири животиње по полу по групи.

1.6.2.3. Дозни нивои и учесталост излагања

Користе се најмање три нивоа дозе испитиване супстанце заједно с истовременом контролном групом. Највиша доза треба да покаже токсичне ефекте, али без великог броја смртних случајева. Најнижа доза не сме да изазове и покаже токсичност.

Средња доза утврђује се у распону између високих и ниских доза.

Код избора нивоа доза узимају се у обзир подаци из претходних испитивања и студија токсичности.

Животиње се обично свакодневно излажу испитиваној супстанци. Ако се хемикалија даје у води за пиће или се умеша у храну, увек је на располагању.

1.6.2.4. Контроле

Истовремено се користи контролна група које је у сваком погледу идентична експерименталним групама, осим изложености испитиваној супстанци .

У посебним околностима, као што су инхалационе студије које обухватају аеросоле или коришћење емулгатора чија биолошка активност није окарактерисана у оралним студијама, истовремено се користи и негативна контролна група. Негативна контролна група третира се на исти начин као и експерименталне групе, само што се животиње не излажу испитиваној супстанци нити било ком помоћном средству.

1.6.2.5. Пут примене

Два главна пута примене су орални и инхалациони. Избор пута примене зависи од физичких и хемијских карактеристика испитиване супстанце и од могућег пута уноса код људи.

Коришћење дермалног пута представља значајан практични проблем. О хроничној системској токсичности која произлази из перкутане апсорпције може се извести закључак из резултата другог оралног испитивања и знања о степену перкутане апсорпције добијеном из претходних испитивања перкутане токсичности.

1.6.2.6. Студије са пероралним путем примене

Кад се испитивана супстанца апсорбује из гастроинтестиналног тракта и ако је то пут уноса којим могу бити изложени људи, предлаже се перорални пут примене, осим ако постоје контраиндикације.

Животиње могу да добијају испитивану супстанцу у храни, растворену у води за пиће или им се може давати у капсулама.

Идеално је дневно дозирање током седам дана недељно, јер примена одређене дозе на бази пет дана недељно може да омогући опоравак или повлачење токсичности у периоду у којем се не примењује испитивана супстанца и тиме да утиче на резултат и каснију процену. Са становишта праксе, дозирање на бази пет дана недељно сматра се прихватљивим.

1.6.2.7. Студије са инхалационим путем примене

Како студије са инхалационим путем примене представљају технички проблем који је сложенији од других путева примене, овде се детаљније наводи тај начин примене. Напомиње се да интратрахеално уливање може бити добра алтернатива у специфичним ситуацијама.

Дугорочно излагање обично се планира према пројектованој изложености људи. Животиње се дневно излажу шест сати после изједначења концентрација у комори, пет дана у недељи (испрекидана изложеност) или, погодној амбијенталној изложености, 22 до 24 сата изложености дневно током седам дана недељно (непрекидна изложеност) са једним сатом за храњење животиња у слично време сваког дана и за одржавање коморе. У оба случаја животиње се излажу фиксним концентрацијама испитиване супстанце. Највећа разлика између испрекидане и непрекидне изложености је што у првом случају постоји период од 17 до 18 сати током кога се животиње могу опоравити од ефеката свакодневне изложености, са чак и дужим временом опоравка током викенда.

Избор испрекидане или непрекидне изложености зависи од циљева студије и од изложености људи која ће се симулирати. Разматрају се одређене техничке тешкоће. На пример, предности непрекидне изложености која симулира услове животне средине могу се поништити потребом давања воде и храњења за време изложености и потребом за сложенијим (и поузданим) техникама за стварање и посматрање аеросола и паре.

1.6.2.8. Коморе за излагање

Животиње се подвргавају испитивању у инхалационим коморама дизајнираним тако да одржавају динамичан проток ваздуха с најмање 12 измена ваздуха у једном сату, како би се осигурала одговарајућа концентрација кисеоника и равномерно распоређена атмосфера. Контролне коморе и коморе за излагање су једнаке у конструкцији и дизајниране тако да обезбеђују услове излагања који су упоредиви у свим погледима, изузев изложености испитиваној супстанци. Слаби негативни притисак у комори се углавном одржава за спречавање испуштања испитиване супстанце у околно подручје.

Коморе минимизују пренасељеност експерименталних животиња. Као опште правило које обезбеђује стабилност атмосфере у комори, користи се мера према којој запремина експерименталних животиња не сме прелазити 5% запремине коморе.

Мере се и прате следећи параметри:

а) Проток ваздуха: препоручује се да се брзина протока ваздуха прати непрекидно;

б) Концентрација: у периоду дневног излагања концентрација испитиване супстанце не сме да варира више од ± 15% од средње вредности;

в) Температура и влага: за глодаре се температура одржава на 22° C ± 2° C, а влага у комори на 30% до 70%, осим ако се користи вода за суспендовање испитиване супстанце у атмосферу коморе. Препоручује се да се температура и влага прате непрекидно;

г) Мерења величине честица: расподела величине честица одређује се у атмосфери коморе које садрже течне или чврсте аеросоле. Честице аеросола су такве величине да их експерименталне животиње могу удисати. Узорци ваздуха коморе узимају се у зони дисања животиња. Узорак ваздуха мора бити типичан представник расподеле честица којима су животиње изложене и обухвата, на гравиметријској бази, сав суспендовани аеросол, чак и ако се много аеросола не може удисати. За време развоја генеришућег система често се обављају анализе величине честица да би се обезбедила стабилност аеросола, а после тога се анализе величине честице обављају онолико често колико захтева време излагања, да би се правилно одредила конзистенција расподеле честица којима су животиње биле изложене.

1.6.2.9. Трајање испитивања

Период давања је најмање 12 месеци.

1.6.3. Поступак

1.6.3.1. Посматрања

Пажљиво клиничко испитивање обавља се најмање једном дневно. Додатна посматрања обављају се свакодневно уз предузимање одговарајућих мера како би се губитак животиња за време извођења студије свео на минимум, на пример постмортални преглед или залеђавање оних животиња које се пронађу мртве и изолација или лишавање живота на хуман начин слабих животиња или животиња на самрти. Обављају се пажљива посматрања да би се открио почетак и напредовање токсичних ефеката, као и да би се свео на минимум губитак због болести, аутолизе или канибализма.

Клинички знаци, укључујући неуролошке промене и промене на очима, бележе се за све животиње. Бележе се и време почетка и напредовање токсичних ефеката, укључујући сумњиве туморе.

Телесне масе бележе се појединачно за све животиње једном недељно у првих 13 недеља периода испитивања, а после тога најмање једном сваке четири недеље. Узимање хране одређује се недељно за време првих 13 недеља студије, а потом у интервалима од око три месеца, осим ако здравствено стање или промене у телесној маси не диктирају другачије.

1.6.3.2. Хематолошки преглед

Хематолошки преглед (нпр. садржај хемоглобина; укупна запремина крвних ћелија; укупан број еритроцита, укупан број леукоцита, тромбоцита или мерења других параметара коагулације) обавља се после три месеца, после шест месеци, а после тога у интервалима од око шест месеци и по завршетку испитивања из узорака крви свих животиња које нису глодари и узорака крви 10 пацова по полу свих група. Ако је могуће, узорци су од истих пацова у сваком интервалу. Узимају се и узорци од животиња које нису глодари.

Ако клиничка посматрања дају наговештај погоршања здравља животиња за време студије, од животиња код којих се наслућује погоршање здравља, узимају се узорци крви и ради се диференцијална крвна слика.

Диференцијална крвна слика ради се код животиња из групе која је подвргнута највишој дози и код контролне групе. Диференцијална крвна слика ради се код животиња које су подвргнуте нешто мањој дози само ако постоји велика разлика између групе са највишом дозом и контролне групе или ако је индикована на основу патолошких налаза.

1.6.3.3. Анализа мокраће

За анализу се узимају узорци мокраће од животиња које нису глодари и од 10 пацова по полу, ако је могуће од истих пацова у једнаким интервалима у којима се обављају и хематолошке анализе. Код појединачних животиња или на збирним („pool") узорцима по полу и по групи за глодаре одређују се:

– изглед: запремина и густина за појединачне животиње;

– протеини, глукоза, кетони, скривено крварење (семиквантитативно);

– микроскопски преглед седимента (семиквантитативно);

– медицинска биохемија.

У интервалима од око шест месеци и на крају испитивања, узимају се узорци крви за медицинско-биохемијска мерења од свих животиња које нису глодари и 10 пацова по полу свих група, по могућности од истих пацова у сваком интервалу. Узорци за прелиминарна испитивања узимају се од животиња које нису глодари. У плазми тих узорака одређују се:

– концентрација укупних протеина;

– концентрација албумина;

– испитивања функције јетре (као што је активност алкалне фосфатазе, глутаминске пируват трансаминазе[VII], активност глутаминске оксалоацетатне трансаминазе[VIII]), гама глутамил транспептидазе, орнитин декарбоксилазе;

– метаболизам угљених хидрата, као што је глукоза у крви после гладовања;

– испитивања функције бубрега као што је азот из урее у крви.

_____

VII Сада позната као серумска аланин аминотрансфераза.

VIII Сада позната као серумска аспартат аминтрансфераза.

1.6.3.4. Постмортални преглед

Постмортални преглед се обавља на свим животињама, укључујући оне које су угинуле за време експеримента или су лишене живота на хуман начин јер су биле на самрти. Пре лишавања живота на хуман начин од свих животиња узимају се узорци крви за диференцијалну крвну слику. Чувају се све видљиве лезије, тумори или лезије за које се сумња да су тумори. Покушава се да се доведу у везу опажене промене с микроскопским налазима.

Сви органи и ткива чувају се за хистопатолошке прегледе. Ово се обично односи на следеће органе и ткива: мозак[IX] (медула и понс, церебеларни кортекс, церебрални кортекс), хипофиза, штитна жлезда (укључујући паратиороидну жлезду), тимус, плућа (укључујући трахеју), срце, аорта, пљувачне жлезде, јетра[IX], слезина, бубрези[IX], надбубрежне жлезде[IX], једњак, желудац, дуоденум, танко црево, слепо црево, дебело црево, ректум, материца, мокраћна бешика, лимфни чворови, панкреас, полне жлезде[IX], остали генитални органи, код женки млечне жлезде, кожа, мускулатура, периферни живци, кичмена мождина (цервикална, торакална, лумбална), грудна кост с коштаном сржи (укључујући зглобове) и очи. За одговарајући хистопатолошки преглед важно је надувавање плућа и мокраћне бешике са фиксативом на оптималан начин да се сачувају та ткива, као и надувавање плућа код инхалационих студија. У посебним студијама, као што су инхалационе студије, прегледа се целокупан респираторни тракт, укључујући нос, ждрело и гркљан.

Ако су обављени други клинички прегледи, добијени резултати су на располагању пре микроскопског прегледа, јер то може бити смерница за патолога.

_____

IX Мере се органи од десет животиња по полу по групи за глодаре и животиње које нису глодари, плус тироидна жлезда (с паратироидним жлездама) за животиње које нису глодари.

1.6.3.5. Хистопатологија

Све видљиве промене, нарочито тумори и друге лезије настале у било ком органу, микроскопски се прегледају. Препоручују се следећи поступци:

а) Микроскопски преглед свих сачуваних органа и ткива с комплетним описом свих лезија нађених:

1) код свих животиња које су угинуле или су лишене живота на хуман начин за време студије;

2) у свим групама које су добијале високу дозу и у контролној групи;

б) Органи или ткива код којих су пронађене абнормалности узроковане или вероватно узроковане испитиваном супстанцом испитују се и код животиња из група са нижом дозом;

в) Ако резултат испитивања докаже битно скраћење нормалног животног века животиње или ефекте који могу да утичу на токсичну реакцију, наредни нижи дозни ниво испитује се на начин који је горе описан;

г) За исправну процену значаја промена које су примећене код третираних животиња неопходни су подаци о настанку лезија до којих обично долази код врсте животиња које се користе, под истим лабораторијским условима, тј. историјски контролни подаци.

2. ПОДАЦИ

Подаци се наводе табеларно, где се за сваку испитивану групу животиња наводи број животиња на почетку експеримента, број животиња са лезијама и проценат животиња са сваком врстом лезије. Сви добијени резултати анализирају се одговарајућом статистичком методом. Може се користити било која усвојена статистичка метода.

3. ИЗВЕШТАЈ

3.1. ИЗВЕШТАЈ О ИСПИТИВАЊУ

Извештај о испитивању, ако је могуће, садржи податке о:

– врсти, варијетету, извору, условима средине, исхране;

– експерименталним условима: апаратури за излагање испитиваној супстанци укључујући дизајн, врсту, димензије апаратуре, као и извор ваздуха, систем за производњу честица и аеросола, метода за кондиционирање ваздуха, обрада искоришћеног ваздуха и метода чувања животиња у комори. Описује се опрема за мерење температуре, влаге и, где је могуће, стабилност концентрације аеросола или величину честице;

– излагању испитиваној супстанци: ови подаци се приказују табеларно са средњим вредностима и мерама варијабилности (нпр. стандардна девијација) и обухватају податке о:

а) брзини протока ваздуха кроз опрему за инхалацију;

б) температури и влажности ваздуха;

в) номиналној концентрацији (укупном садржају испитиване супстанце која се уводи у опрему за инхалацију, подељеним са запремином ваздуха);

г) природи помоћног средства, ако је коришћен;

д) стварним концентрацијама супстанце у зони удисања;

ђ) средњој величини честица (где је потребно),

– висини дозе (укључујући и помоћно средство, ако се користило) и концентрације;

– токсичној реакцији по полу и дози;

– нивоу без ефекта;

– времену смрти за време студије или да ли су животиње преживеле до краја експеримента;

– опис токсичних и других ефеката;

– времену када је примећен сваки знак абнормалности и његов каснији ток;

– храни и телесној маси;

– офталмолошким налазима;

– хематолошким испитивања и свим резултатима;

– медицинско биохемијским испитивањима и свим резултатима (укључујући резултате анализе урина);

– налазима обдукције;

– детаљан опис свих хистопатолошких налаза;

– статистичкој процени резултата, где је могуће;

– образложењу резултата;

– тумачењу резултата.

3.2. ПРОЦЕНА И ТУМАЧЕЊЕ РЕЗУЛТАТА

Видети Општи увод.

4. ЛИТЕРАТУРА

Видети Општи увод.

B.31. ИСПИТИВАЊЕ ТОКСИЧНОСТИ ПО ПРЕНАТАЛНИ РАСТ И РАЗВОЈ

1. МЕТОДА ИСПИТИВАЊА

Ова метода заснива се на Упутству за испитивање OECD 414 (2001).

1.1. УВОД

Ова метода за испитивање токсичности по раст и развој намењена је за добијање општих података о ефектима пренаталног излагања на гравидне експерименталне животиње и на организам током раста и развоја у материци. Ово може да обухвати процену ефеката на мајку, као и смрт, структуралне абнормалности или измењен раст плода. Функционални недостаци, иако чине важан део раста и развоја, нису саставни део ове методе испитивања. Они се могу испитивати у посебној студији или као додатак овај студији, коришћењем методе испитивања неуротоксичности по раст и развој. Подаци о испитивању функционалних недостатака и других ефеката после рођења, се траже у одговарајућем испитивању репродуктивне токсичности на две генерације и испитивању неуротоксичности по раст и развој.

Ова метода испитивања може захтевати специфично прилагођавање у појединачним случајевима на основу специфичног знања о нпр. физичким и хемијским или токсиколошким својствима испитиване супстанце. Такво прилагођавање је прихватљиво ако уверљиви научни докази показују да ће се прилагођавањем добити бољи квалитет података. У таквом случају, ови научни докази пажљиво се документују у извештају о испитивању.

1.2. ДЕФИНИЦИЈЕ

Токсикологија раста и развоја јесте студија о штетним ефектима на организам током раста и развоја који се могу појавити као последица излагања пре зачећа, током пренаталног раста и развоја или постнатално до времена полног сазревања. Највеће манифестације токсичности по раст и развој обухватају: 1) смрт организма, 2) структуралне абнормалности, 3) измењени раст, 4) функционалне недостатке. Токсикологија раста и развоја се раније често називала тератологија.

Штетни ефекат јесте свака промена полазног стања повезана са третманом која умањује способност организма да преживи, репродукује се или прилагоди животној средини. У најширем смислу, токсикологија раста и развоја обухвата сваки ефекат који ремети нормалан развој заметка и пре и после рођења.

Измењен раст јесте промена масе или величине органа или организма потомака.

Алтерације (аномалије) јесу структурне промене у расту и развоју које обухватају и малформације и варијације[28].

Малформација/већа абнормалност јесте структурна промена која се сматра штетном за животињу (може бити и смртоносна) и обично је ретка.

Варијација/мања абнормалност јесте структурна промена за коју се сматра да има мали или никакав штетан ефект на животињу; може бити пролазна и може се појавити релативно често у контролној популацији.

Заметак јесте збир деривата оплођеног јајашца у било којој фази раста и развоја од оплодње до рођења, укључујући екстраембрионалне мембране, као и ембрион или плод.

Имплантација (нидација) јесте припајање бластоциста на епителни слој материце, укључујући његову пенетрацију кроз епител материце и усађивање у ендометријум.

Ембрион јесте рана или развојна фаза било ког организма, нарочито производа оплођења јајашца који се развија после појаве дугачке осе и до појаве свих већих структура.

Ембриотоксичност јесте штетност за нормалну структуру, развој, раст и/или способност преживљавања ембриона.

Плод јесте нерођени потомак у периоду после ембрионалног.

Фетотоксичност јесте штетност за нормалну структуру, развој, раст и/или способност преживљавања плода.

Побачај јесте превремено избацивање производа зачећа из материце: ембриона или плода који није способан за преживљавање.

Ресорпција јесте заметак који, после имплантације у материцу, касније умре и ресорбује се или је ресорбован.

Рана ресорпција јесте доказ о имплантацији без препознатљивог ембриона/плода.

Касна ресорпција јесте мртви ембрион или плод са спољњим дегенеративним променама.

NOAEL јесте скраћеница за највиши ниво дозе или излагања, код кога нису примећени штетни ефекти повезани са третманом.

1.3. РЕФЕРЕНТНЕ СУПСТАНЦЕ

Нису прописане.

1.4. ПРИНЦИП МЕТОДЕ

Обично се испитивана супстанца даје гравидним животињама најмање од имплантације до једног дана пре дана планираног лишавања живота на хуман начин, који је што ближи нормалном дану порођаја без опасности од губитка података који произлазе из прераног порођаја. Експериментална метода није намењена само за испитивање периода органогенезе (тј. 5 до 15 дана код глодара и 6 до 18 дана код кунића), него и за испитивање ефеката од преимплантације, ако одговара, током читавог периода гестације до дана пре царског реза. Мало пре царског реза женке се лишавају живота на хуман начин, прегледа се садржај материце, а плодови се процењују према спољним видљивим аномалијама, као и према променама на меким ткивима и костуру.

1.5. ОПИС МЕТОДЕ

1.5.1. Избор животињске врсте

Препоручује се да се испитивање обавља на најрелевантнијим врстама и да се користе лабораторијске врсте и варијетети који се обично користе код испитивања токсичности по пренатални раст и развој. Препоручена врста глодара је пацов, а препоручена врста која не припада глодарима је кунић. Када се користе животиње других врста наводи се разлог за ово коришћење.

1.5.2. Услови смештаја и исхрана

Температура експерименталне собе где се држе животиње је 22º C (± 3º C) за глодаре, а 18º C (± 3 ºC) за куниће. Релативна влажност ваздуха износи најмање 30% али не више од 70% осим кад се просторије чисте. Најбоље је одржавати влажност ваздуха између 50% и 60%. Осветљење је вештачко и то у интервалима 12 сати светла и 12 сати мрака. За храњење

се могу примењивати устаљене лабораторијске дијете са неограниченим количинама воде за пиће. Поступак парења се изводи у кавезима који су одговарајући за ту сврху. Парене животиње препоручљиво је држати појединачно у кавезу, али је прихватљиво и чување у малим групама.

1.5.3. Припрема животиња

Користе се здраве животиње које су се током најмање пет дана привикле на лабораторијске услове и које раније нису биле подвргнуте експерименталним поступцима. Експерименталне животиње се означавају према врсти, варијетету, извору, полу, телесној маси и/или старости. Животиње свих експерименталних група су једнаке телесне масе и старости, колико год је изводљиво. За сваки дозни ниво користе се младе одрасле женке које нису раније рађале. Женке се паре с мужјацима исте врсте и варијетета, а парење између брата и сестре се избегава. За глодаре је нулти дан гестације дан кад се опази вагинални чеп и/или сперма. За куниће је нулти дан обично дан коитуса или вештачке оплодње, уколико се користи ова техника. Парене женке додељују се случајним избором контролним групама или групама које се третирају. Кавези се постављају тако да се појава могућих ефеката због положаја кавеза сведе на минимум. Свакој животињи се додељује јединствени идентификацијони број. Парене женке се случајним избором додељују контролним групама или групама које се третирају, а ако су се женке париле у гомили, животиње из сваке гомиле подједнако се расподељују по групама. Женке које је оплодио исти мужјак се расподељују по групама.

1.6. ПОСТУПАК

1.6.1. Број и пол животиња

Свака третирана и контролна група садржи довољан број женки, тако да се на постморталном прегледу нађе око 20 женки са имплантима. Групе са мање од 16 животиња са имплантима могу да буду неодговарајуће. Студија се не одбацује обавезно због морталитета мајки, ако се обезбеди да морталитет не прелази приближно 10%.

1.6.2. Припрема доза

Ако се за лакше дозирање користи помоћно средство или други адитив, узимају се у обзир следеће карактеристике: ефекти на апсорпцију, расподелу, метаболизам и задржавање или излучивање испитиване супстанце; ефекти на хемијска својства испитиване супстанце која могу изменити њене токсиколошке карактеристике; ефекти на потрошњу хране или воде или исхрањеност животиња. Помоћно средство не сме да буде токсично по раст и развој, нити сме да има ефекте на репродукцију.

1.6.3. Дозирање

Обично се испитивана супстанца даје свакодневно од имплантације (нпр. пети дан после парења) до дана пре планираног царског реза. Ако прелиминарне студије, када су доступне, не упућују на високу опасност од преимплантационог губитка, третман се може продужити толико да обухвати читав период гестације, од парења до дана пре планираног лишавања живота на хуман начин. Добро је познато да неодговарајућа манипулација или стрес током трудноће могу да узрокују пренатални губитак. Ради чувања од пренаталног губитка због фактора који нису у вези са третманом, избегава се непотребна манипулација скотним животињама, као и стрес због спољашњих фактора као што је бука.

Користе се најмање три нивоа дозе и истовремена контрола. Здраве животиње додељују се контролним групама и групама које се третирају случајним избором. Дозни нивои се довољно разликују како би произвеле градацију токсичних ефекта. Осим ако не постоји ограничење због физичке/хемијске природе или биолошких својстава испитиване супстанце, највиша доза се одређује с циљем да изазове одређену токсичност по раст и развој и/или по мајку (клинички знаци или смањење телесне масе), али не смрт или тешку патњу. Најмање један средњи дозни ниво производи минималне приметне токсичне ефекте. Најнижи дозни ниво не сме да изазове никакав доказ токсичности нити по мајку нити по раст и развој. Опадајући низ нивоа доза бира се у циљу доказивања неке реакције која је зависна од дозирања и нивоа при коме није опажен штетни ефекат (NOAEL). За одређивање опадајућих нивоа доза обично су оптимални двоструки до четвороструки интервали, а често се препоручује четврта експериментална група уместо примене врло великих интервала између доза (нпр. више од фактора 10). Иако је циљ утврђивање NOAEL-а мајке, могу се прихватити и студије које не утврђују овај ниво[1].

Дозни нивои бирају се узимајући у обзир све постојеће податке о токсичности, као и додатне податке о метаболизму и токсикокинетици испитиване супстанце или сродних материјала. Ови подаци помажу и код доказивања адекватности режима дозирања.

Користи се и истовремена контролна група. Ова група мора да буде привидно третирана контролна група или контролна група за помоћно средство, ако се оно користи приликом примене испитиване супстанце. Свим групама даје се иста запремина или испитиване супстанце или помоћног средства. Са животињама у контролним групама поступа се на исти начин као са онима у експерименталним групама. Контролне групе помоћног средства добијају помоћну материју у највећој количини која се користи (као код група које се третирају најнижим концентрацијама).

1.6.4. Испитивање граничне дозе

Ако испитивање на једном нивоу дозе од најмање 1.000 mg/kg TM/дан примењене орално уз коришћење поступака описаних у овој студији не произведе приметну токсичност код гравидних животиња или код њиховог потомства и ако се ефекат на основу постојећих података (нпр. из једињења која су структурно и/или метаболички слична) не очекује, није потребна потпуна студија уз коришћење три нивоа дозе. Очекивана изложеност људи може да укаже на потребу да се у испитивању граничне дозе користи виша орална доза. За друге врсте примене, као што су инхалација или дермална примена, физичка и хемијска својства испитиване супстанце често могу индиковати и ограничити ниво излагања који се максимално може постићи (на пример дермална апликација не сме да узрокује изражену локалну токсичност).

1.6.5. Примена доза

Испитивана супстанца или помоћно средство обично се даје орално интубацијом. Ако се користи други пут примене, лице која обавља испитивање оправдава и образлаже свој избор и вероватно су неопходне одговарајуће измене[2, 3, 4]. Испитивана супстанца се примењује у приближно исто време сваког дана.

Доза за појединачне животиње заснива се на последњој одређеној индивидуалној телесној маси. Потребан је опрез код прилагођавања дозе током последњег триместра трудноће. Приликом избора дозе користе се постојећи подаци како би се спречила прекомерна токсичност по мајку. Ако се региструје прекомерна токсичност код третираних (гравидних) женки, те животиње се хумано лишавају живота. Ако неколико гравидних животиња покаже знаке прекомерне токсичности, разматра се завршетак (лишавање живота на хуман начин) те дозне групе. Ако се супстанца примењује оралном сондом, препоручује се да се животињама даје у једној дози употребом желудачне цеви или одговарајуће интубационе каниле. Максимална запремина течности коју је дозвољено дати одједном зависи од величине експерименталне животиње. Запремина не сме бити већа од 1 ml/100 g ТМ, осим у случају водених раствора где се може користити 2 ml/100 g ТМ. Ако се као помоћно средство користи кукурузно уље запремина не сме да буде већа од 0,4 ml/100 g ТМ. Варијабилност у запремини која се испитује своди се на минимум прилагођавањем концентрација како би се обезбедила стална запремина код свих дозних нивоа.

1.6.6. Посматрање (гравидних) женки

Клиничка посматрања обављају се и бележе најмање једном дневно, ако је могуће у исто време сваког дана, узимајући у обзир главни период током кога се јављају предвиђени ефекти после примене дозе. Бележе се стања животиња, укључујући смртност, стање пред смрт, битне промене понашања и сви знаци очигледне токсичности.

1.6.7. Телесна маса и потрошња хране

Животиње се мере: нултог дана гестације и најкасније трећег дана гестације ако је парене животиње набавио спољни узгајивач; првог дана дозирања; најмање свака три дана током периода дозирања и на дан планираног лишавања живота на хуман начин.

Потрошња хране се бележи свака три дана и подудара се са данима одређивања телесне масе.

1.6.8. Постмортални преглед

Женке се лишавају живота на хуман начин један дан пре очекиваног дана порођаја. Женке које показују знаке побачаја или превременог порођаја лишавају се живота и подвргавају детаљном макроскопском прегледу пре планираног лишавања живота.

За време лишавања живота на хуман начин или у случају смрти током студије, женка се макроскопски прегледа у циљу откривања било које структуралне абнормалности или патолошке промене. Процена женки за време царског реза и каснија анализа плода обавља се обично без познавања података о третираној групи како би се грешке свеле на минимум.

1.6.9. Преглед садржаја материце

Одмах по лишавању живота на хуман начин или што пре након смрти, узимају се материце и проверава стање трудноће животиња. Материце које нису гравидне потребно је даље прегледати (нпр. бојењем амонијум сулфидом за глодаре и Salewski бојењем или одговарајућом алтернативном методом за куниће) како би се потврдило да не постоји трудноћа[5].

Мери се маса гравидне материце са цервиксом. Код животиња које су нађене мртве током студије не мере се масе гравидних материца.

За гравидне животиње одређује се број жутих тела.

Садржаји материца прегледају се како би се утврдио број смрти ембриона или плода и плодова који су способни за живот. Описује се степен ресорпције како би се проценило релативно време смрти заметка (видети одељак 1.2. ове методе).

1.6.10. Преглед плода

Одређује се пол и телесна маса сваког плода. Сваки плод се прегледа како би се утврдиле спољашње промене[6].

Плодови се прегледају на измене костура и меких ткива (нпр. варијације и малформације или аномалије)[7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24]. Категоризација феталних промена се препоручује, али није обавезна. Ако се обави категоризација, јасно се наводе критеријуми за одређивање сваке категорије. Посебна пажња се обраћа на репродуктивни тракт који се прегледа на знакове измењеног раста и развоја.

За глодаре, око једне половине сваког окота припрема се и прегледа промене на костуру. Преостале животиње из окота припремају се и прегледају на промене у меким ткивима коришћењем прихваћених или одговарајућих метода серијске секције или пажљиве технике сецирања.

Код животиња које нису глодари, нпр. кунића, сви плодови се прегледају на промене у меким ткивима и костуру. Тела тих плодова процењују се пажљивим сецирањем и тражењем промена на меким ткивима, што може да обухвати поступке за даљу процену интерне кардијалне структуре[25]. Главе једне половине плодова прегледане на тај начин уклањају се и обрађују за процену промена на меким ткивима (укључујући очи, мозак, назалне шупљине и језик) коришћењем стандардних метода серијске секције[26] или неке подједнако осетљиве методе. Тела тих плодова и преостали недирнути плодови обрађују се и прегледају на промене на костуру, користећи исте методе као што је описано за глодаре.

2. ПОДАЦИ

2.1. ОБРАДА РЕЗУЛТАТА

Подаци се наводе појединачно за женке, као и за њихове потомке и приказују табеларно. Подаци се наводе за сваку експерименталну групу и генерацију и то: број животиња на почетку испитивања, број животиња које су нађене мртве за време испитивања или су лишене живота из хуманих разлога, време сваке смрти или хуманог лишења живота, број гравидних женки, број животиња које показују знакове токсичности, опис знакова уочене токсичности, укључујући време појаве, трајања и тежине сваког токсичног ефекта, врсте примећених појава које ембриона/плода и све релевантне податке о окоту.

Нумерички подаци се процењују одговарајућом статистичком методом, уз узимање окота као јединице за анализу података. Користи се општеприхваћена статистичка метода. Статистичке методе се бирају приликом планирања испитивања и оне се морају оправдати. У извештају о испитивању наводе се и подаци о животињама које нису преживеле до планираног лишавања живота на хуман начин. Ако је релевантно ови подаци се могу укључити у средње вредности за групе. Релевантност података добијених од таквих животиња, па и укључивање или искључење из средњих вредности групе, оправдава се и процењује на индивидуалној основи.

2.2. ПРОЦЕНА РЕЗУЛТАТА

Налази испитивања токсичности по пренатални раст и развој процењују се у смислу примећених ефеката. Процена обухвата:

– резултате испитивања мајке и ембриона/плода, укључујући процену односа или њихово одсуство, између излагања животиња испитиваној супстанци и учесталости и озбиљности свих налаза;

– критеријуме коришћене за категоризацију спољног изгледа плода, промена меког ткива и костура, ако је обављена категоризација;

– кад одговара, контролне податке из раније студије како би се побољшало тумачење резултата испитивања;

– нумеричке вредности коришћене за израчунавање свих процената или индекса;

– одговарајућу статистичку анализу налаза испитивања, где одговара, која обухвата податке о методи анализе, тако да независни аналитичар/статистичар може да реевалуира и реконструише анализу.

У свакој студији која показује одсуство било каквих токсичних ефеката разматрају се даља истраживања како би се утврдила апсорпција и биорасположивост испитиване супстанце.

2.3. ТУМАЧЕЊЕ РЕЗУЛТАТА

Испитивање токсичности по пренатални раст и развој даје податке о ефектима понављаног излагања супстанци током гравидитета на женке и на интраутерини развој њихових потомака. Резултати испитивања тумаче се у вези са налазима из субхроничне, репродуктивне, токсикокинетичке и других студија. Како је нагласак стављен и на општу токсичност у смислу токсичности по мајку и на показатеље токсичности по раст и развој, резултати испитивања дозвољавају у одређеној мери разликовање између ефеката на раст и развој до којих долази у одсуству опште токсичности и оних ефеката који су индуковани само при нивоима који су токсични и за гравидне животиње[27].

3. ИЗВЕШТАЈ

Извештај о испитивању садржи податке о:

1) Испитиваној супстанци:

– физичка својства и, где је неопходно, физичка и хемијска својства;

– идентификација укључујући CAS број ако је познат/утврђен;

– чистоћу.

2) Помоћном средству (ако се користи):

– оправдање за избор помоћног средства, ако се не ради о води.

3) Експерименталним животињама:

– коришћена врста и варијетет;

– број и старост животиња;

– извор, услови смештаја, дијета итд.;

– индивидуалне телесне масе животиња на почетку испитивања.

4) Експерименталним условима:

– образложење за избор нивоа дозе;

– појединости о формулацији испитиване супстанце/припрема хране, постигнута концентрација, стабилност и хомогеност препарата;

– појединости о примени испитиване супстанце;

– конверзија концентрације испитиване супстанце у храни/води за пиће (ppm) до стварне дозе (mg/kg ТМ/дан), ако је примењиво;

– услови животне средине;

– подаци о квалитету хране и воде.

5) Резултатима:

– Подаци о токсичној реакцији код мајке, укључују, али нису ограничени на:

– број животиња на почетку испитивања, број преживелих животиња, број гравидних женки и број побачаја и број животиња које су се превремено окотиле;

– датум смрти током студије или да ли су животиње преживеле до лишавања живота на хуман начин;

– податке о животињама које нису преживеле до планираног лишавања живота на хуман начин, али се не укључују у статистичко поређење између група;

– датум уочавања сваког абнормалног клиничког знака и каснији ток;

– телесна маса, промене телесне масе и маса гравидне материце, укључујући, по избору, промену телесне масе кориговане за тежину гравидне материце;

– потрошња хране и, ако је мерена, потрошња воде;

– налази обдукције, укључујући тежину материце;

– NOAEL вредности за ефекте на мајку и раст и развој.

6) Крајњим показатељима ефекта на раст и развој по дози за окот са имплантима, укључујући:

– број жутих тела;

– број имплантација, број и проценат живих и мртвих плодова и ресорпција;

– број и проценат пред- и постимплантациионих губитака.

7) Крајњим показатељима ефекта на раст и развој по дози за окоте са живим плодовима, укључујући:

– број и проценат живих потомака;

– однос полова;

– телесна маса, најбоље по полу и са комбинованим половима;

– малформације спољног изгледа, меких ткива и костура и друге релевантне промене;

– критеријуми за категоризацију, ако одговара;

– укупан број и проценат плодова и окота са спољашњим променама, променама меког ткива или костура, као и врста и инциденца индивидуалних аномалија и других релевантних промена.

8) Образложењу резултата.

9) Закључцима.

4. ЛИТЕРАТУРА

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; 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; 386-398.

3. Wong, B.A., et al. (1997) Developing Specialized Inhalation Exposure Systems to Address Toxicological Problems. CIIT Activities 17; 1-8.

4. US Environmental Protection Agency (1985) Subpart E-Specific Organ/Tissue Toxicity, 40 CFR 798.4350: Inhalation Developmental Toxicity Study.

5. Salewski, E. (1964) Faerbermethode zum Makroskopischen Nachweis von Implantations Stellen am Uterusder Ratte. Naunyn-Schmeidebergs Archiv fur Pharmakologie und Experimentelle Pathologie 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; 171-173.

8. Igarashi, E. et al. (1992) Frequency Of Spontaneous Axial Skeletal Variations Detected by the Double Staining Techniquefor Ossified and Cartilaginous Skeleton in Rat Foetuses. Congenital Anomalies 32; :381-391.

9. Kimmel, C.A. et al. (1993) Skeletal Development Following Heat Exposure in the Rat. Teratology 47:229-242.

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; 476.

11.Barrow, M.V. and Taylor, W.J. (1969) A Rapid Method for Detecting Malformations in Rat Foetuses. Journal of Morphology 127:291-306.

12. Fritz, H. (1974) Prenatal Ossification in Rabbits ss Indicative of Foetal Maturity. Teratology 11; 313-320.

13. Gibson, J.P. et al. (1966) Use of the Rabbit in Teratogenicity Studies. Toxicology and Applied Pharmacology 9; :398-408.

14. Kimmel, C.A. and Wilson, J.G. (1973) Skeletal Deviation in Rats: Malformations or Variations Teratology 8; 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; 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, pp. 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; 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; 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; 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; 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, pp 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; 233-239.

25. Staples, R.E. (1974) Detection of visceral Alterations in Mammalian Foetuses. Teratology 9; 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, T.E. (eds.). University of Chicago, Chicago, IL, pp. 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; 249-292.

B.32. ИСПИТИВАЊЕ КАРЦИНОГЕНОСТИ

1. МЕТОДА ИСПИТИВАЊА

1.1. УВОД

Видети Општи увод.

1.2. ДЕФИНИЦИЈЕ

Видети Општи увод.

1.3. РЕФЕРЕНТНЕ СУПСТАНЦЕ

Нису прописане.

1.4. ПРИНЦИП МЕТОДЕ

Обично се испитивана супстанца примењује одговарајућим путем седам дана недељно код неколико група експерименталних животиња, једна доза по групи, током већег дела њиховог животног века. За време и после излагања испитиваној супстанци експерименталне животиње се свакодневно посматрају како би се открили знакови токсичности, нарочито развој тумора.

1.5. КРИТЕРИЈУМИ КВАЛИТЕТА

Нису прописани.

1.6. ОПИС МЕТОДЕ

Експерименталне животиње држе се под експерименталним условима чувања и храњења најмање пет дана пре испитивања. Здраве младе животиње пре испитивања се случајним избором распоређују у третиране и контролне групе.

1.6.1. Припреме

1.6.1.1. Експерименталне животиње

На основу резултата претходних студија могу се користити различите врсте животиња (глодари или други). Испитивању се подвргавају здрави млади примерци животиња лабораторијских врста које се најчешће користе у оваквим експериментима, а давање дозе започиње у што краћем временском року после одбијања од сисе.

Варијације у телесној маси коришћених животиња на почетку студије не смеју бити веће од ± 20% средње вредности. Ако се изводи субхронична орална студија као увод у дугорочну студију у обе студије се користе исте врсте и сојеви животиња.

1.6.1.2. Број и пол

За глодаре користи се најмање 100 животиња (50 женки и 50 мужјака) за сваки дозни ниво и истовремену контролну групу. Узимају се женке које нису раније рађале и које нису гравидне. Ако се планирају лишавања живота на хуман начин у току експеримента број животиња се повећава за број животиња које су планиране за лишавање живота пре завршетка испитивања.

1.6.1.3. Дозни нивои и учесталост излагања

Користе се најмање три дозе испитиване супстанце уз истовремену контролу. Највиша доза показује знаке минималне токсичности, као што је благо смањење добијања на телесној маси (мање од 10%), без битне промене нормалног животног века због ефеката, осим кад се ради о туморима.

Најнижа доза не сме да утиче на нормални раст, развој и дужину живота животиња нити да да било какву назнаку токсичности. Најнижа доза не сме да буде нижа од 10% од високе дозе.

Средња доза утврђује се у средини распона између високих и ниских доза.

Код избора висине доза узимају се у обзир подаци из претходних испитивања токсичности и студија.

Животиње се обично свакодневно излажу испитиваној супстанци. Ако се хемикалија даје у води за пиће или се умеша у храну, непрекидно је на располагању.

1.6.1.4. Контроле

Истовремено се користи контролна група која је у сваком погледу иста као експерименталне групе, осим излагања испитиваној супстанци.

У посебним околностима као што су инхалационе студије које укључују аеросоле или коришћење емулгатора чија биолошка активност није окарактерисана у оралним студијама, истовремено се користи и додатна контролна група која се не излаже помоћном средству.

1.6.1.5. Пут примене

Три главна пута примене су: перорални, дермални и инхалациони. Избор пута примене зависи од физичких и хемијских карактеристика испитиване супстанце и могућег пута излагања код људи.

1.6.1.6. Студије са пероралним путем примене

Кад се испитивана супстанца апсорбује из гастроинтестиналног тракта и ако је то пут којим људи могу бити изложени, предлаже се перорални начин примене, осим ако постоје контраиндикације. Животиње могу да добију испитивану супстанцу у храни, растворену у води за пиће или им се може давати у капсулама.

Идеално је дневно дозирање током седам дана недељно, јер примена дозе на бази пет дана недељно може да омогући опоравак или повлачење токсичности у периоду у коме се не примењује испитивана супстанца и тиме да утиче на резултат и каснију процену. Дозирање на бази пет дана недељно сматра се прихватљивим.

1.6.1.7. Студије са дермалним путем примене

Кутано излагање премазивањем коже може се изабрати да симулира главни пут излагања људи и као систем – модел за

изазивање лезија на кожи.

1.6.1.8. Студије са инхалационим путем примене

Како студије са инхалационим путем примене представљају технички проблем који је сложенији од других начина примене, овде се детаљније наводи тај начин давања. Добра алтернатива у специфичним случајевима може бити интратрахеално укапавање.

Дуготрајна излагања се осмишљавају по пројектованој изложености људи, па се животиње дневно излажу шест сати после изједначења концентрација у комори, пет дана у недељи (испрекидана изложеност) или, код евентуалне амбијенталне изложености, 22 до 24 сата изложености током седам дана недељно (непрекидна изложеност) са око једним сатом дневно за храњење животиња у слично време и за одржавање коморе. У оба случаја животиње се излажу фиксним концентрацијама испитиване супстанце.

Главна разлика између испрекидане и непрекидне изложености је у томе што у првом случају постоји период од 17 до 18 сати током кога се животиње могу опоравити од ефеката појединачне дневне изложености, са чак и дужим временом опоравка током викенда.

Избор испрекидане или непрекидне изложености зависи од циљева испитивања и од симулиране изложености људи. Разматрају се одређени технички проблеми. На пример, предности непрекидне изложености за симулирање услова животне средине могу да делују супротно због потребе давања воде и храњења за време изложености и потребе за сложенијим (и поузданим) техникама за стварање и праћење аеросола и паре.

1.6.1.9. Коморе за излагање

Животиње се подвргавају испитивању у инхалационим коморама дизајнираним тако да одржавају динамичан проток ваздуха с најмање 12 измена ваздуха у једном сату како би се обезбедио одговарајући садржај кисеоника и равномерно распоређена атмосфера. Контролне коморе и коморе за излагање су једнаке у конструкцији и дизајниране тако да обезбеђују услове излагања који су упоредиви у свим погледима, изузев изложености испитиваној супстанци. У комори се одржава благи негативни притисак због спречавања испуштања испитиване супстанце у окружење. Коморе смањују на минимум пренасељеност експерименталних животиња. Како би се обезбедила стабилност атмосфере у комори, правило је да укупна „запремина” експерименталних животиња не прелази 5% запремине коморе.

Мере се и прате следећи параметри:

а) Проток ваздуха: препоручује се да се брзина протока ваздуха кроз комору непрестано прати;

б) Концентрација: у периоду дневног излагања концентрација испитиване супстанце не сме да варира за више од ± 15% од средње вредности. Током целог испитивања концентрације из дана у дан одржавају се што је могуће сталнијим;

в) Температура и влага: за глодаре се температура одржава на 22° C ± 2° C, а влага у комори на 30% до 70%, осим ако се користи вода за суспендовање испитиване супстанце у атмосферу коморе. Препоручује се да се температура и влажност непрестано прате;

г) Мерења величине честица: расподела величине честица одређује се у атмосфери коморе која садржи течне или чврсте аеросоле. Честице аеросола су такве величине да их експерименталне животиње могу удисати. Узорци атмосфере коморе узимају се у зони дисања животиња. Узорак ваздуха је репрезентативан за расподелу честица којима су животиње изложене и обухвата, на гравиметријској бази, сав суспендовани аеросол, чак и ако се не може удисати много аеросола. За време развоја генеришућег система, често се обављају анализе величине честица, како би се обезбедила стабилност аеросола, а после тога онолико често колико је потребно током излагања, како би се правилно одредила расподела честица којима су животиње биле изложене.

1.6.1.10. Трајање испитивања

Трајање испитивања карциногености обухвата већи део животног века експерименталних животиња. Испитивање се завршава после 18 месеци за мишеве и хрчке, а после 24 месеца за пацове. За одређене врсте животиња с дужим животним веком и/или ниском стопом спонтане појаве тумора испитивање се завршава после 24 месеца за мишеве и хрчке, а после 30 месеци за пацове. Алтернативно је прихватљив завршетак такве продужене студије када број преживелих животиња с најнижом дозом или контролна група достигне 25%. Код завршетка испитивања у коме је видљива разлика између полова, сваки пол се посебно разматра. Ако због видљиве токсичности превремено угине само група изложена високој дози, то не мора да буде разлог за завршетак испитивања, ако токсичне манифестације не узрокују проблеме у осталим групама. Како би се прихватио негативан резултат, највише 10% животиња од било које групе може да се изгуби због аутолизе, канибализма или проблема услед манипулације, а преживљавање у свим групама треба да буде веће од 50% после 18 месеци за мишеве и хрчке, а после 24 месеца за пацове.

1.6.2. Поступак

1.6.2.1. Посматрања

Дневна посматрања животиња у кавезу обухватају промене на кожи и крзну, очима и слузницама, као и респираторном, циркулаторном систему и аутономном и централном нервном систему, соматомоторну активност и модел понашања.

Неопходно је редовно посматрати животиње како би се обезбедило, колико је могуће, да се животиње не изгубе из студије због канибализма, аотолизе ткива или стављања на погрешно место. Када се примете животиње на самрти, оне се изолују и обдукују.

Клинички знаци и морталитет се бележе за све животиње. Посебна пажња се обраћа на развој тумора: потребно је забележити време појаве; локацију, димензије, изглед и раст сваког голим оком видљивог тумора или тумора који се палпира.

Мерења потрошње хране (и воде, ако се испитивана супстанца даје у води за пиће) обављају се једном недељно током првих 13 недеља испитивања, а потом у интервалима од око три месеца, осим ако здравствено стање или промене телесне масе не захтевају другачије.

Телесна маса се бележи појединачно за све животиње једном недељно током првих 13 недеља испитивања, а после тога најмање на сваке четири недеље.

1.6.2.2. Клиничка испитивања

1.6.2.2.1. Хематологија

Ако се посматрањем животиња у кавезима примети погоршање здравља током студије, за све животиње код којих је примећено погоршање ради се диференцијална крвна слика.

После 12 месеци, 18 месеци и пре лишавања живота на хуман начин, од животиња се узима узорак крви. Диференцијална крвна слика ради се у узорцима животиња из групе којој је давана висока доза и животиња у контролним групама. Ако ти подаци, нарочито они добијени пре лишавања живота на хуман начин или подаци патолошког прегледа, укажу на потребу израде диференцијалне крвне слике, иста се ради и у групи с наредном нижом дозом.

1.6.2.2.2. Постмортални преглед

Постмортални преглед се изводи на свим животињама, укључујући оне које су угинуле за време експеримента или су лишене живота на хуман начин јер су нађене на самрти. Чувају се све видљиве лезије, тумори или лезије за које се сумња да су тумори.

У одговарајућем медијуму за евентуални каснији хистопатолошки преглед чувају се следећи органи и ткива: мозак (укључујући делове продужене мождине/понса, коре малог мозга, коре великог мозга), хипофиза, тироидна/паратироидна жлезда, тимусна ткива, душник и плућа, срце, аорта, пљувачне жлезде, јетра, слезина, бубрези, надбубрежне жлезде, гуштерача, полне жлезде, материца, остали генитални органи, кожа, једњак, желудац, дванаестопалачно црево, танко црево, слепо црево, дебело црево, ректум, мокраћна бешика, репрезентативан лимфни чвор, женске млечне жлезде, мускулатура бедра, периферни живци, грудна кост са костном сржи, фемур (укључујући зглоб), кичмена мождина на три нивоа (цервикална, средње-торакална и лумбална) и очи.

Инфлација (надувавање) плућа и мокраћне бешике с фиксативом је оптималан начин да се сачувају та ткива. Инфлација плућа код инхалационих студија је суштинска за одговарајући хистопатолошки преглед. Код инхалационих студија чува се читав респираторни тракт, укључујући носну шупљину, ждрело и гркљан.

1.6.2.2.3. Хистопатологија

а) Комплетна хистопатолошка испитивања се обављају на органима и ткивима свих животиња које су угинуле или су лишене живота на хуман начин током испитивања и у контролној групи и групи којој је давана висока доза.

б) У свим групама микроскопски се прегледају сви тумори видљиви голим оком или лезије за које се сумња да би могли бити тумори.

в) Ако постоји значајна разлика у инциденци неопластичких лезија у групи којој је давана висока доза и у контролној групи, хистопатолошки прегледи на тим органима или ткивима изводе се и у другим групама.

г) Ако је преживљавање у групи којој је давана висока доза битно мање него у контролној групи, обавља се комплетно испитивање групе наредне ниже дозе.

д) Ако у групи којој је давана висока доза постоји доказ о изазивању токсичних или других ефеката који су могли утицати на неопластичну реакцију, обавља се комплетно испитивање животиња у групи с наредном нижом дозом.

2. ПОДАЦИ

Подаци се наводе табеларно, где се за сваку испитивану групу животиња наводи: број животиња на почетку експеримента, број животиња с туморима откривеним током експеримента, време откривања и број животиња код којих је нађен тумор после лишавања живота на хуман начин. Сви добијени резултати анализирају се одговарајућом статистичком методом. Може се користити било која усвојена статистичка метода.

3. ИЗВЕШТАЈ

3.1. ИЗВЕШТАЈ О ИСПИТИВАЊУ

Извештај о испитивању, ако је могуће, садржи податке о:

1) Врсти, соју, извору, условима средине, исхрани;

2) Експерименталним условима: опис апаратуре за излагање (укључујући дизајн, врсту, димензије апаратуре, као и извор ваздуха, систем за генерисање партикулата и аеросола, метода за кондиционирање ваздуха, обрада искоришћеног ваздуха и метода чувања животиња у експерименталној комори, ако се користи. Описује се опрема за мерење температуре, влажности и, када одговара, стабилност концентрације аеросола или величину честица).

3) Излагању:

– ови подаци се приказују табеларно са средњим вредностима и мером варијабилности (нпр. стандардна девијација) и обухватају податке о:

а) брзини протока ваздуха кроз опрему за инхалацију;

б) температури и влажности ваздуха;

в) номиналној концентрацији (укупном садржају испитиване супстанце која се уводи кроз опрему за инхалацију, подељеном са запремином ваздуха);

г) природи помоћног средства, ако је коришћено;

д) концентрацији супстанце у зони удисања;

ђ) средњој величини честица (где је потребно),

– нивоима дозе (укључујући помоћно средство, ако је коришћено) и концентрације;

– о инциденцама тумора по полу, дози и врсти тумора;

– времену смрти током испитивања или да ли су животиње преживеле до жтрвовања;

– о токсичном одговору по полу и дози;

– опис токсичних или других ефеката;

– времену када је примећен сваки знак абнормалности и њеном каснијем току;

– храни и телесној маси;

– изведеним хематолошким испитивањима и свим резултатима истих;

– налазима обдукције;

– детаљан опис свих хистопатолошких налаза;

– статистичкој обради резултата с описом коришћене методе.

4) Образложењу резултата.

5) Тумачењу резултата.

3.2. ПРОЦЕНА И ТУМАЧЕЊЕ РЕЗУЛТАТА

Видети Општи увод.

4. ЛИТЕРАТУРА

Видети Општи увод.

B.33. КОМБИНОВАНО ИСПИТИВАЊЕ ХРОНИЧНЕ ТОКСИЧНОСТИ/КАРЦИНОГЕНОСТИ

1. МЕТОДА ИСПИТИВАЊА

1.1. УВОД

Видети Општи увод.

1.2. ДЕФИНИЦИЈЕ

Видети Општи увод.

1.3. РЕФЕРЕНТНЕ СУПСТАНЦЕ

Нису прописане.

1.4. ПРИНЦИП МЕТОДЕ

Циљ комбинованог испитивања хроничне токсичности карциногености јесте одређивање хроничних и карциногених ефеката супстанце код сисара после продужене изложености.

У ту сврху у испитивање карциногености се додатно укључује најмање једна пратећа група и контролна пратећа група. Доза која се користи код пратеће групе са високом дозом може да буде већа од оне која се користи код групе са високом дозом у испитивању карциногености. Животиње се у испитивању карциногености прегледају како би се уочила општа токсичност, као и карциногени одговор. Животиње из третиране пратеће групе прегледају се на општу токсичност.

Испитиваном супстанцом више група експерименталних животиња третира се седам дана недељно, одговарајућим путем, једном дозом по групи и то током највећег дела њиховог живота. За време и после излагања испитиваној супстанци,

експерименталне животиње се свакодневно посматрају ради откривања знакова токсичности и развоја тумора.

1.5. КРИТЕРИЈУМИ КВАЛИТЕТА

Нису прописани.

1.6. ОПИС МЕТОДЕ

Животиње се држе под експерименталним условима смештаја и исхране најмање пет дана пре испитивања. Пре испитивања здраве младе животиње се случајним избором додељују групама за третирање и контролним групама.

1.6.1. Припреме

1.6.1.1. Експерименталне животиње

Најпогоднија врста је пацов. На основу резултата претходних испитивања могу се користити и друге врсте (глодарске или не). Користе се младе и здраве животиње уобичајено коришћених лабораторијских линија. Са дозирањем се почиње што је могуће пре након одбијања од сисе.

На почетку испитивања варијација у телесној маси животиња не треба да буде већа од ± 20% средње вредности. Када се пре дугорочног испитивања изводи испитивање субхроничне оралне токсичности у оба испитивања се користе исте врсте и сојеви/линије животиња.

1.6.1.2. Број и пол

За глодаре је потребно користити најмање 100 животиња (50 женки и 50 мужјака) за сваки дозни ниво и истовремену контролну групу. Користе се женке које нису раније рађале и које нису гравидне. Уколико се планира лишавање живота на хуман начин у току испитивања, потребно је повећати број животиња за онолико колико ће бити лишено живота пре завршетка испитивања.

Третирана пратећа група или групе за одређивање патологије различите од тумора обухватају по 20 животиња сваког пола, док контролна пратећа група обухвата по 10 животиња сваког пола.

1.6.1.3. Дозни нивои и учесталост излагања

У сврху испитивања карциногености потребно је користити најмање три нивоа доза поред истовремене контролне групе. Највећи дозни ниво изазива знаке минималне токсичности, као што је мало успорење добијања на телесној маси (мање од 10%), а да се при томе нормални животни век не мења битно услед узрока који су другачији од појаве тумора.

Најмањи дозни ниво не ремети нормални раст, развој и животни век животиње, нити ствара икакве назнаке токсичности. Овај ниво није нижи од 10% високе дозе.

Средња доза се установљава на око половине распона између високе и ниске дозе.

Дозни нивои се бирају узимајући у обзир податке из претходних испитивања и студија токсичности.

У сврху испитивања хроничне токсичности у испитивање се укључују додатне пратеће групе – третиране и истовремена контролна група. Висока доза код третираних пратећих животиња изазива дефинитивне знаке токсичности.

Учесталост излагања је свакодневно. Ако се хемикалија даје у води за пиће или је умешана у храну, потребно је да вода и храна буду стално доступне животињама.

1.6.1.4. Контроле

Користи се истовремена група која је у сваком погледу идентична третираним групама, осим по излагању испитиваној супстанци.

У посебним околностима, као што је испитивање инхалационе токсичности која укључује аеросоле или употреба емулгатора без окарактерисаног биолошког дејства у студијама оралне токсичности потребно је користити додатну контролну групу која није изложена растварачу.

1.6.1.5. Пут примене

Три главна пута примене су: перорални, дермални и инхалациони. Избор пута примене зависи од физичких и хемијских карактеристика испитиване супстанце и од могућег пута излагања код људи.

1.6.1.6. Испитивања перорално

Када се испитивана супстанца апсорбује из гастроинтестиналног тракта, а то је и пут уноса којим могу бити изложени људи, уколико не постоје контраиндикације најбоље је применити перорални пут примене. Животиње испитивану супстанцу могу да добијају путем хране, растворену у води за пиће или у облику капсуле. У идеалном случају се користи дневно дозирање седам дана у недељи, јер дозирање на бази пет дана недељно може да омогући опоравак или повлачење токсичности у периоду без дозирања, што може да утиче на резултат и процену. На основу разматрања практичности, дозирање на бази пет дана недељно сматра се прихватљивим.

1.6.1.7. Испитивања дермалним путем примене

За симулацију у случају када је главни пут изложености људи преко коже и као модел за изазивање повреда коже, може

се изабрати излагање премазивањем коже.

1.6.1.8. Испитивања инхалационим путем примене

Испитивања инхалационим путем примене представљају сложенији технички проблем од других путева примене, те се из тог разлога дају детаљнија упутства о том начину. У посебним случајевима интратрахијална инстилација може да представља оправдану алтернативу.

Дуготрајна излагања се планирају према пројектованом излагању људи тако што се после уравнотежења концентрација у комори животиње дневно излажу по шест сати, пет дана у недељи (повремено излагање) или, у односу на могуће излагање у животној средини, 22 до 24 сата дневно седам дана недељно (непрекидно излагање), са једним сатом дневно (у приближно исто време) за храњење животиња и за одржавање комора. У оба случаја животиње су изложене фиксним концентрацијама испитиване супстанце. Главна разлика између повременог и непрекидног излагања је да у првом случају постоји период од 17 до 18 сати током ког се животиње могу опоравити од ефекта дневног излагања, уз још дужи период опоравка током викенда.

Избор повременог или непрекидног излагања зависи од циљева испитивања и од симулираног излагања људи. У обзир се узимају одређене техничке потешкоће. На пример, предности непрекидног излагања за симулацију услова животне средине могу бити смањене због потребе појења и храњења за време излагања и због потребе за компликованијим (и поузданијим) техникама продукције аеросола и пара, као и због праћења.

1.6.1.9. Коморе за инхалационо излагање

Животиње се испитују у коморама за инхалационо излагање које су пројектоване да подржавају динамички проток од најмање 12 промена ваздуха на сат како би се обезбедио адекватан садржај кисеоника и равномерно распоређена атмосфера излагања. Контролне коморе и коморе за излагање су идентичне конструкције и дизајна, како би се обезбедили услови излагања који се у свим аспектима могу упоредити, осим у погледу излагања испитиваним супстанцама. У унутрашњости коморе обично се одржава негативни притисак због спречавања испуштања испитиване супстанце у околни простор. Коморе су такве да се гомилање експерименталних животиња сведе на минимум. Опште је правило да, због стабилности атмосфере у комори, укупна запремина животиња не сме да прелази 5% запремине коморе.

Мере се и прате следећи параметри:

а) Проток ваздуха: проток ваздуха кроз комору непрекидно се контролише;

б) Концентрација: током дневне изложености концентрација не сме да одступа више од ± 15% од средње вредности. За време укупног трајања испитивања, концентрације се из дана у дан одржавају што је могуће стабилнијим;

в) Температура и влажност: за глодаре температуру се одржава на 22° C ± 2° C, а влажност у комори на 30% до 70%, осим у случају када се употребљава вода за суспендовање испитиване супстанце у атмосферу коморе. Препоручује се непрекидно праћење температуре и влажности;

г) Мерења величине честица: расподела величине честица одређује се у атмосфери коморе када она укључује течне или чврсте аеросоле. Честице аеросола су величине коју експериментална животиња може да удише. Узорци атмосфере из комора узимају се у зони удисања. Узорак ваздуха је репрезентативан за расподелу честица којима су животиње изложене и пружа гравиметријски податак о укупном аеросолу, чак и онда када се већи део аеросола не удише. Анализе величине честица обављају се често током развијања генераторског система како би се обезбедила стабилност аеросола, а потом онолико често колико је потребно да се адекватно утврди конзистенција расподеле честица којима су животиње изложене.

1.6.1.10. Трајање испитивања

Трајање дела испитивања карциногености подразумева највећи део нормалног животног века експерименталних животиња. Завршетак испитивања у случају мишева и хрчака је у 18 месеци старости, а за пацове 24 месеца. Код одређених сојева животиња које имају дужи животни век и/или нижу стопу спонтане појаве тумора, завршетак испитивања је 24 месеца за мишеве и хрчке, а 30 месеци за пацове. Алтернативно се може прихватити завршетак таквог продуженог испитивања када број преживелих у групи са најнижом дозом или контролној групи достигне 25%. Ако се приликом завршетка испитивања уоче знатне разлике међу половима, сваки пол се одвојено разматра. Кад због очигледне токсичности пре времена угине само група која је примала високу дозу, испитивање се не прекида уколико токсичност не узрокује проблеме у другим групама. Да би се прихватио негативни резултат испитивања, не сме бити изгубљено више од 10% животиња у свакој групи због аутолизе, канибализма или поступања, а преживљавање код свих група не сме да буде мање од 50% после 18 месеци за мишеве и хрчке, а после 24 месеца за пацове.

Пратеће групе од 20 дозираних животиња по полу и 10 прикључених контролних животиња по полу које се користе за испитивање хроничне токсичности се на испитивању задржавају најмање 12 месеци. Те животиње се лишавају живота на хуман начин због испитивања патологије која је у вези са испитиваном супстанцом, а која није додатно закомпликована геронтолошким променама.

1.6.2. Поступак

1.6.2.1. Посматрања

Животиње у кавезима свакодневно се посматрају у погледу промена на кожи и крзну, очима и слузницама, као и дисајном, циркулаторном, аутономном и централном нервном систему, промена соматомоторних активности и модела понашања.

На животињама у испитиваним пратећим групама у одговарајућим интервалима се обављају клинички прегледи.

Редовно посматрање животиња потребно је због обезбеђивања, колико је могуће, да не дође до губитка испитиваних животиња због канибализма, аутолизе ткива или грешком. Животиње на самрти се одмах одвајају и врши се обдукција.

За све животиње потребно је забележити клиничке знаке, укључујући и неуролошке и промене на оку и угинућа. Посебна пажња се посвећује развоју тумора: времену настанка, месту, димензијама, изгледу и прогресији сваког видљивог и опипљивог тумора. Потребно је забележити и време настанка и прогресију токсичних ефеката.

Недељно се мери потрошња хране (и воде, кад се испитивана супстанца даје путем воде за пиће) током првих 13 недеља испитивања, а после тога у интервалима од око три месеца, осим ако здравствено стање или промене телесне масе не захтевају другачије.

Телесна маса се бележи индивидуално за све животиње, једном недељно током првих 13 недеља периода испитивања, а после тога најмање једном у сваке четири недеље.

1.6.2.2. Клинички прегледи

1.6.2.2.1. Хематологија

Хематолошки преглед (тј. садржај хемоглобина, укупна запремина ћелија, укупан број црвених крвних ћелија, укупан број белих крвних ћелија, крвних плочица или други параметри коагулабилности) се обавља после три месеца, после шест месеци, а после тога у интервалима од око шест месеци и на завршетку испитивања на узорцима крви узетих од 10 пацова по полу из свих група. Ако је могуће, у сваком интервалу се узимају узорци од истих пацова.

Уколико се током посматрања утврди погоршање здравственог стања животиња, потребно је урадити диференцијалну крвну слику одговарајућих животиња.

Диференцијална крвна слика врши се на узорцима животиња из групе с највећом дозом и контролне групе. Диференцијална крвна слика врши се на следећој нижој групи/групама само ако се утврде значајне разлике између највише групе и контроле или ако је индиковано због патолошких налаза.

1.6.2.2.2. Анализа мокраће

За анализу се узимају узорци мокраће од 10 пацова сваког пола из свих група, ако је могуће од истих пацова, у истим интервалима као и хематолошки прегледи.

За сваку појединy животињу или на „pool” узорку по полу по групи глодара одређује се:

– изглед: запремина и густина по појединој животињи;

– протеини, глукоза, кетон, окултна крв (семи-квантитативно);

– микроскопски преглед седимената (семи-квантитативно).

1.6.2.2.3. Медицинска биохемија

У интервалима од око шест месеци и на завршетку испитивања узимају се узорци крви од свих животиња које нису глодари за биохемијска мерења и 10 узорака од пацова по полу из свих група, ако је могуће увек од истих животиња. Потребно је узети претходне узорке од животиња које нису глодари. У плазми ових узорака одређује се:

– концентрација укупних протеина;

– концентрација албумина;

– испитивања функције јетре (као што су активност алкалне фосфатазе, активност глутмат пируват трансаминазе[X] и активност глутамат оксалоацетат трансаминазе[XI]), гама глутамил транспептидаза, орнитин декарбоксилаза;

– метаболизам угљених хидрата, као што је глукоза у крви после гладовања;

– испитивања функције бубрега као што је азот у урији у крви (у даљем тексту: BUN).

_____

X позната као серумска аланин аминотрансфераза

XI позната као серумска аспартат аминотрансфераза

1.6.2.2.4. Постмортални преглед

Комплетна одукција се изводи на свим животињама, укључујући и оне које су угинуле током испитивања или које су лишене живота на хуман начин јер су нађене на самрти. Пре лишавања живота на хуман начин потребно је од свих животиња узети узорке крви за различите анализе. Чувају се сви видљиви тумори и озледе за које се сумња да су тумори. Предузимају се све мере за повезивање уочених промена с микроскопским налазима.

Сви органи и ткива се чувају за хистопатолошке прегледе. То подразумева следеће органе и ткива: мозак[XII] (медула/понс, кора малог мозга, кора великог мозга); хипофиза, тироидеа (укључујући паратироидеу), тимус, плућа (укључујући трахеју), срце, аорту, пљувачне жлезде, јетру[XII], слезину, бубреге[XII], надбубрежне жлезде[XII], једњак, желудац, дуоденум,

јејенум, илеум, слепо црево, колон, ректум, мокраћна бешика, лимфни чворови, панкреас, поллне жлезде[XII], помоћни генитални органи; женска млечна жлезда, кожа, мускулатура, периферни живци, кичма (цервикална, торакална, лумбална), стернум са коштаном сржи и фемур (са зглобом) и очи.

Иако инфлација (надувавање) плућа и мокраћне бешике помоћу фиксатива представља оптимални начин за конзервирање тих ткива, у испитивањима инхалационе токсичности надувавање плућа је неопходно за одговарајући хистопатолошки преглед. Код специфичних испитивања, као што су испитивања инхалационе токсичности, потребно је прегледати цео респираторни тракт, укључујући и нос, ждрело и гркљан.

Уколико се обављају друга клиничка испитивања, добијени подаци треба да буду доступни пре микроскопског прегледа, јер патологу могу дати значајне смернице.

_____

XII Мери се маса органима (узетим од по 10 животиња по полу по групи глодара)

1.6.2.2.5. Хистопатологија

За део испитивања хроничне токсичности:

Потребно је детаљно прегледати све сачуване органе свих животиња из пратеће групе високе дозе и из контролне групе. Ако се патолошки налаз узорка из пратеће групе високе дозе може повезати с испитиваном супстанцом, циљни органи свих животиња из осталих третираних пратећих група се на крају испитивања подвргавају потпуном и детаљном хистолошком прегледу, као и они из погођених група из дела испитивања карциногености.

За део испитивања карциногености:

а) На органима и ткивима свих животиња које су угинуле или биле лишене живота на хуман начин током испитивања, као и свих животиња из контролне групе и групе високе дозе обавља се потпуни хистопатолошки преглед;

б) Сви тумори видљиви голим оком или промене за које се сумња да су тумори нађене код свих група и на било ком органу прегледају се микроскопски;

в) Уколико постоји значајна разлика у учесталости појаве неопластичних промена код групе високог дозног нивоа и контролне групе, потребно је обавити хистопатолошки преглед на одређеном органу или ткиву у другим групама;

г) Ако је преживљавање код групе високог дозног нивоа знатно мање него у контролној групи, потребно је детаљно прегледати следећу групу са нижим нивоом дозе;

д) Ако код групе високог дозног нивоа постоји доказ о узроковању токсичности или о другим ефектима који могу да утичу на неопластичну реакцију, потребно је детаљно прегледати групу следећег нижег дозног нивоа.

2. ПОДАЦИ

Подаци се наводе табеларно и за сваку испитивану групу наводи се: број животиња на почетку испитивања, број животиња код којих су се појавили тумори или токсични ефекти утврђених током испитивања, време откривања и број животиња код којих су тумори установљени по лишавању живота на хуман начин. Резултати се процењују одговарајућом статистичком методом. Може се применити било која призната статистичка метода.

3. ИЗВЕШТАЈ

3.1. ИЗВЕШТАЈ О ИСПИТИВАЊУ

Извештај о испитивању, ако је могуће, садржи податке о:

1) Врсти, соју, извору, условима средине, исхрани.

2) Условима испитивања: опис апаратуре за инхалационо излагање (укључујући дизајн, тип, димензије, извор ваздуха, систем генерисања честица и аеросола, начин климатизовања ваздуха, третман искоришћеног ваздуха и метода смештаја животиња у експерименталним коморама, ако се примењују. Описује се уређај за мерење температуре, влажности и, када одговара, стабилности концентрације аеросола и величине честица).

3) Излагању:

– ови подаци се наводе у облику табеле у којој се приказују средње вредности и мера одступања (тј. стандардна девијација) и укључују:

а) податке о протоку ваздуха кроз опрему за инхалацију;

б) температуру и влажност ваздуха;

в) номиналне концентрације (укупна количине испитиване супстанце додате у опрему за инхалацију, подељена са запремином ваздуха);

г) природу растварача, ако је коришћен;

д) концентрацију у зони удисања;

ђ) средњу величина честица (где је применљиво);

– дозним нивоима (укључујући растварач, ако се користи) и концентрације;

– учесталости појаве тумора по полу, дози и типу тумора;

– времену смрти током испитивања или да ли су животиње преживеле до краја, укључујући пратећу групу;

– токсичној реакцији по полу и дози;

– опис токсичних или других ефеката;

– времену уочавања сваког знака абнормалности и њен даљи ток;

– офталмолошким налазима;

– храни и телесној маси;

– примењеним хематолошким испитивањима и свим резултатима;

– примењеним медицинско-биохемијским испитивањима и свим резултатима (укључујући и анализу урина);

– обдукционим налазима;

– детаљан опис свих хистопатолошких налаза;

– статистичкој обради резултата са описом примењених метода.

4) Образложењу резултата.

5) Тумачењу резултата.

3.2. ПРОЦЕНА И ТУМАЧЕЊЕ РЕЗУЛТАТА

Видети Општи увод.

4. ЛИТЕРАТУРА

Видети Општи увод.

B.34. ИСПИТИВАЊЕ ТОКСИЧНОСТИ ПО РЕПРОДУКЦИЈУ НА ЈЕДНОЈ ГЕНЕРАЦИЈИ

1. МЕТОДА ИСПИТИВАЊА

1.1. УВОД

Видети Општи увод.

1.2. ДЕФИНИЦИЈЕ

Видети Општи увод.

1.3. РЕФЕРЕНТНЕ СУПСТАНЦЕ

Нису прописане.

1.4. ПРИНЦИП МЕТОДЕ

Испитивана супстанца примењује се у растућим дозама у групама мужјака и женки. Мужјацима се даје супстанца током раста и током најмање једног сперматогененог циклуса (око 56 дана код миша, а 70 дана код пацова) како би се изазвали штетни ефекти супстанце која се испитује на сперматогенезу.

Женке родитељске (P) генерације се дозирају током најмање два комплетна циклуса „еструса” како би се изазвали штетни ефекти испитиване супстанце по „еструс”. После тога се животиње паре. Испитивана супстанца се примењује код оба пола током периода парења, а после тога само женкама током гравидитета и током периода дојења.

За примену инхалационим путем метода захтева модификацију.

1.5. КРИТЕРИЈУМИ КВАЛИТЕТА

Нису прописани.

1.6. ОПИС МЕТОДЕ

1.6.1. Припреме

Пре испитивања здраве младе животиње се случајним избором распоређују у третиране и контролне групе. Животиње се држе у условима експерименталног смештаја и исхране најмање пет дана пре испитивања.

Препоручује се да се испитивана супстанца даје у храни или води за пиће. Прихватају се и други путеви примене. Током одговарајућег експерименталног периода свим животињама се даје супстанцу на исти начин. Ако се употребљава растварач или адитиви да би се олакшало дозирање, они не смеју да изазивају токсични ефекат.

Дозирање је седам дана недељно.

1.6.1.1. Експериментални животиње

1.6.1.1.1. Избор врсте

Препоручене врсте су пацови или мишеви. Користе се здраве животиње које раније нису биле подвргнуте испитивањима. Не користе се сојеви за које се зна да су слабо плодни. Експерименталне животиње треба окарактерисати по врсти, соју, полу, телесној маси и/или старости.

За адекватну процену плодности потребно је посматрати и мужјаке и женке. Када испитивање започне ниједна експериментална животиња, било из третиране или из контролне групе, не сме да буде у фази сисања.

1.6.1.2. Број и пол

Свака експериментална и контролна група има довољан број животиња како би се добило око 20 гравидних женки непосредно пре или близу окота.

Циљ је да се произведе довољно трудноћа и потомства како би се обезбедила сврсисходна процена потенцијала супстанце да утиче на плодност, гравидитет и мајчинско понашање у P генерацији животиња, и одојчад, раст и развој F_1 потомака од зачећа до одбијања од сисе.

1.6.1.3. Услови испитивања

Обезбеђује се слободан приступ храни и води. Уочи кођења, гравидне женке се смештају у посебне кавезе за кођење или узгој и даје им се материјал за гнежђење.

1.6.1.4. Дозни нивои

Користе се најмање три третиране групе и контролна група. Ако се за примену испитиване супстанце употребљава растварач, контролна група прима највећу коришћену запремину растварача. Уколико испитивана супстанца узрокује смањено узимање или искоришћеност хране, неопходно је користити додатну контролну групу која би се хранила. У идеалном случају, осим ако постоји ограничење физичко/хемијске природе или биолошки ефекти испитиване супстанце, највиши дозни ниво изазива токсичност, али не смртност код животиња родитеља (P). Средња доза изазива минималне токсичне ефекте који би се могли приписати испитиваној супстанци, а ниска доза не изазива никакве приметне штетне ефекте код родитеља или потомака. Када се даје присилним храњењем или као капсула, доза која се даје свакој животињи одређује се према њеној телесној маси и подешавати сваке недеље према променама телесне масе. Дозе за гравидне женке могу се одређивати према телесној маси нултог или шестог дана гравидитета, ако је пожељно.

1.6.1.5. Испитивање граничне дозе

У случају супстанце са ниском токсичношћу, ако дозни ниво од најмање 1.000 mg/kg не производи никакав доказ интерференције са репродукцијом, испитивања при другим дозним нивоима нису неопходна. Ако прелиминарно испитивање при високом дозном нивоу са јасним доказом токсичности по мајку не покаже штетне ефекте на плодност, нису неопходна испитивања других дозних нивоа.

1.6.2. Извођење испитивања

1.6.2.1. Експериментални распореди

Дневно дозирање родитељских (P) мужјака се почиње кад су стари око пет до девет недеља, а након што су одбијени од сисе и аклиматизовани најмање пет дана. Код пацова дозирање се наставља 10 недеља пре периода парења (код мишева осам недеља). Мужјаци се лишавају живота на хуман начин и прегледају или на крају периода парења или се, алтернативно, мужјаци могу задржати на експерименталној исхрани за могућу продукцију другог легла и усмртити и прегледати негде пре краја студије. Дозирање родитељских (P) женки почиње се после најмање пет дана аклиматизације и наставља најмање две недеље пре парења. Дневно дозирање P женки наставља се током периода парења од три недеље, гравидитета и до одбијања од сиса F_1 потомака. Потребно је размотрити модификацију распореда дозирања на основу других података о испитиваној супстанци, као што су подаци о индукцији метаболизма или биоакумулацији.

1.6.2.2. Поступак парења

У испитивању репродуктивне токсичности примењује се парење 1:1 (један мужјак с једном женком) или 1:2 (један мужјак с две женке).

Код поступка парења 1:1, једна женка се смешта с истим мужјаком до појаве гравидитета или после истека периода од три недеље. Сваког јутра женка се прегледа на присутност сперме или вагиналног чепа. Нулти дан гравидитета дефинише се као дан када је утврђена присутност сперме или вагиналног чепа.

Парови који не успеју да се спаре процењују се како би се утврдио узрок неплодности.

Тај поступак може да укључи процедуре као што су додатна могућност парења са другим плодним мужјацима или женкама, микроскопски преглед репродуктивних органа и испитивања циклуса „еструса” или сперматогенезе.

1.6.2.3. Величине легла

Животињама које су примале супстанцу током испитивања плодности дозвољава се нормално кођење и подизање младих до стадијума одбијања од сисе, без стандардизације легла.

Тамо где се примењује стандардизација препоручује се следећа процедура: између првог и четвртог дана после рођења величина легла се може подесити одстрањивањем прекобројних младунаца селекцијом како би се постигло, што је приближније могуће, величина од четири мужјака и четири женке по леглу. Ако број мужјака или женки не допушта селекцију од четири младунца сваког пола по леглу, прихватљиво је и делимично састављање (нпр. пет мужјака и три женке). Прилагођавање се не обавља у леглима с мање од осам младих.

1.6.2.4. Посматрања

Током периода испитивања потребно је бар једном дневно посматрати сваку животињу. Бележе се промене понашања, знаци тешког или продуженог кођења и сви знаци токсичности, укључујући и морталитет. За време периода пред парење и периода парења потребно је дневно обављати мерење потрошње хране. После кођења и за време дојења мерење потрошње хране (и воде, ако се испитивана супстанца даје у води за пиће) се обавља истог дана кад и мерење масе легла. Телесна маса Р мужјака и женки мери се првог дана дозирања, а после тога једном недељно. Ова запажања се наводе за сваку одраслу животињу појединачно.

Трајање гестације рачуна се од нултог дана гравидитета. Свако легло се прегледа што је могуће пре по порођају, како би се утврдио број и пол младих, мртворођених, живих младих и присутност већих аномалија.

Мртворођени и младунци који су лишени живота на хуман начин четвртог дана чувају се и испитују како би се утврдили могући дефекти. Живи младунци се пребројавају и мери се маса легла јутро после рођења и четвртог и седмог дана, а после тога једном недељно, све до завршетка студије, када се животиње мере појединачно. Бележе се физичке или абнормалности у понашању код женки или младунаца.

1.6.2.5. Патологија

1.6.2.5.1. Постмортални преглед

У време лишавања живота на хуман начин или смрти током испитивања животиње Р генерације се макроскопски прегледају како би се утврдиле структурне абнормалности или патолошке промене, с посебно посвећеном пажњом на преглед органа репродуктивног система. Мртви или умирући младунци се прегледају како би се уочили дефекти.

1.6.2.5.2. Хистопатологија

Јајници, утерус, цервикс, вагина, тестиси, епидидимиси, семене кесице, простата, коагулишућа жлезда, хипофиза и циљни орган(и) свих Р животиња се чувају за микроскопски преглед. У случају да се ти органи не прегледају у испитивањима других дозних нивоа, потребно их је микроскопски прегледати код свих животиња изложених високим дозама и код контролних животиња и оних које су угинуле током студије када је изводљиво.

Органи који показују абнормалности код тих животиња прегледају се и код свих других Р животиња. Том приликом потребно је извршити микроскопски преглед свих ткива која показују веће патолошке промене. Као што је препоручено код поступка парења, репродуктивни органи животиња код којих постоји сумња на неплодност подвргавају се микроскопском прегледу.

2. ПОДАЦИ

Подаци се наводе табеларно, тако да се за сваку испитивану групу наводи: број животиња на почетку испитивања, број плодних мужјака, број гравидних женки, типови промена и проценат животиња које показују сваки тип промене.

Када је могуће, нумерички резултати се оцењују помоћу одговарајуће статистичке методе. Може се применити било која прихваћена статистичка метода.

3. ИЗВЕШТАЈ

3.1. ИЗВЕШТАЈ О ИСПИТИВАЊУ

Извештај о испитивању, ако је могуће, садржи податке о:

– врсти/соју;

– токсичном одговору по полу и дози, укључујући плодност, гестацију и виабилитет;

– времену смрти током студије или да ли су животиње преживеле до тренутка предвиђеног лишавања живота на хуман начин или завршетка испитивања;

– табели са подацима о телесној маси сваког легла, средња вредност: маса младунаца и појединачна телесна маса младунаца на крају испитивања;

– токсичним или другим ефектима на репродукцију, потомке или постнатални раст;

– дану утврђивања сваког абнормалног знака и његовог даљег тока;

– телесној маси П животиња;

– налазима обдукције;

– детаљан опис свих микроскопских налаза;

– статистичкој обради резултата, где је могуће;

– образложењу резултата;

– тумачењу резултата.

3.2. ПРОЦЕНА И ТУМАЧЕЊЕ РЕЗУЛТАТА

Видети Општи увод.

4. ЛИТЕРАТУРА

Видети Општи увод.

B.35. ИСПИТИВАЊЕ ТОКСИЧНОСТИ ПО РЕПРОДУКЦИЈУ НА ДВЕ ГЕНЕРАЦИЈЕ

1. МЕТОДА ИСПИТИВАЊА

Ова метода заснива се на Упутству за испитивање OECD 416 (2001).

1.1. УВОД

Ова метода испитивања репродукције на две генерације намењена је да обезбеди опште податке у вези ефеката испитиване супстанце на интегритет и учинак мушких и женских репродуктивних система, укључујући функцију полних жлезда, еструс циклус, парење, зачеће, гестацију, порођај, лактацију и одбијање од сисе и раст и развој потомства. Студија може да пружи и податке о ефектима испитиване супстанце на неонатални морбидитет, морталитет и прелиминарне податке о пренаталној и постналној токсичности по раст и развој и да усмери будућа испитивања. Поред проучавања раста и развоја F_1 генерације, ова експериментална метода се предвиђа и за процену интегритета и способности мушких и женских репродуктивних система, као и раста и развоја F_2 генерације. За додатне податке о токсичности по раст и развој и функционим недостацима, у овај протокол могу се укључити додатни сегменти испитивања, консултујући методе за токсичност по раст и развој и/или неуротоксични ефекти за раст и развој неуротоксичност у периоду раста и развоја, ако одговара, или се ови ефекти могу проучавати у посебним студијама, користећи одговарајуће експерименталне методе.

1.2. ПРИНЦИП МЕТОДЕ

Испитивана супстанца се даје у растућим дозама мушким и женским јединкама у групама. Мужјацима P генерације дају се дозе за време раста и током бар једног целог циклуса сперматогенезе (приближно 56 дана код мишева и 70 дана код пацова) како би се изазвали сви штетни ефекти на сперматогенезу. Ефекти на сперму се одређују бројним параметрима сперме (нпр. морфологија и покретљивост сперматозоида) и припремом ткива и детаљном хистопатологијом. Уколико постоје подаци о сперматогенези из претходне студије која је трајала довољно дуго и у којој је примењено поновљено дозирање, нпр. 90-дневна студија, мужјаке P генерације није потребно укључити у процену. Препоручује се да узорци или дигитални снимци сперме P генерације буду сачувани како би се омогућила каснија процена. Женке P генерације се дозирају током раста и током неколико еструс циклуса како би се уочили било какви штетни ефекти испитиване супстанце на нормалност еструс циклуса. Испитивана супстанца се даје родитељским (P) животињама за време парења, за време гравидитета који су уследили и током одбијања од сисе њиховог F_1 потомства. По одбијању од сисе наставља се са давањем супстанце F_1 потомству током њиховог раста до одраслог доба, парења и продукције F_2 генерације, све док F_2 генерација не буде одбијена од сисе.

Обављају се клиничка опажања и патолошки прегледи на свим животињама како би се утврдили знакови токсичности са посебним нагласком на ефекте на интегритет и способност мушких и женских репродуктивних система и раст и развој потомства.

1.3. ОПИС МЕТОДЕ

1.3.1. Избор животињских врста

Препоручена врста за испитивање је пацов. Уколико се користе друге врсте, даје се оправдање, а неопходне су и одговарајуће измене методе. Не користе се сојеви са слабом плодношћу или они са познатом високом учесталошћу појаве недостатака у расту и развоју. На почетку студије, варијација у телесној маси животиња које се користе мора бити минимална и не сме да прелази 20% средње телесне масе за сваки пол.

1.3.2. Услови смештаја и исхране

Температура у експерименталној просторији за животиње је 22° C (± 3 °C). Релативна влажност је најмање 30%, и по могућности не прелази 70%, осим за време чишћења просторије. Идеална влажност је 50% до 60%. Осветљење је вештачко, уз измену 12 сати светла и 12 сати мрака. За храњење се користи уобичајена лабораторијска исхрана уз неограничену количину воде за пиће. Избор исхране је под утицајем потребе да се обезбеди одговарајућа мешавина испитиване супстанце која се примењује овом методом.

Животиње могу бити смештене појединачно или у кавезима у малим групама истог пола. Парење се обавља у одговарајућим кавезима. После доказане копулације, спарене женке се смештају појединачно у кавезе за порођај или материнство. Спарени пацови могу се држати у малим групама и одвојени један или два дана пре кођења. Спареним животињама се обезбеђује одређени одговарајући материјал за гнежђење непосредно пре порођаја.

1.3.3. Припрема животиња

Користе се здраве младе животиње које су се аклиматизовале на лабораторијске услове током најмање пет дана и које нису биле подвргнуте претходним експерименталним поступцима. Експерименталне животиње треба окарактерисати према врсти, соју, извору, полу, телесној маси и/или старости. Како би се избегло парење сродних животиња мора бити познато било које сродство међу животињама. Животиње се случајним избором разврставају у контролне или третиране групе (препоручује се стратификација по телесној маси). Кавези се распоређују тако да се смање могући ефекти распореда кавеза. Свакој животињи се приписује јединствени идентификациони број. За Р генерацију ово се ради пре почетка дозирања. За F_1 генерацију ово се ради приликом одбијања од сисе за животиње које су одабране за парење. Подаци о леглу из ког потиче животиња чувају се за све изабране F_1 животиње. Појединачна идентификација младунаца одмах после рођења препоручује се приликом индивидуалног мерења младунаца или приликом разматрања било каквог функционалног испитивања.

Родитељске (Р) животиње треба да буду старе око пет до девет недеља на почетку дозирања. Животиње свих експерименталних група су, колико је изводљиво, уједначене телесне масе и старости.

1.4. ПОСТУПАК

1.4.1. Број и пол животиња

Свака експериментална и контролна група има довољан број животиња како би се добило не мање од 20 гравидних женки на порођају или пред порођај. За супстанце које узрокују нежељене ефекте током третмана (нпр. стерилност, изражена токсичност при висиоким дозама) ово није могуће. Циљ је да се добије довољно трудноћа како би се обезбедила значајна оцена потенцијала супстанце да утиче на плодност, трудноћу и материнско понашање, сисање, раст и развој F_1 потомства од зачећа до зрелости, као и на раст и развој њиховог потомства (F_2) до одбијања од сисе. Ако се не постигне жељени број гравидних животиња (односно 20) студија се не сматра обавезно неодговарајућом и процењује се од случаја до случаја.

1.4.2. Припрема доза

Препоручује се да се испитивана супстанца даје перорално (путем хране, воде за пиће или сондом), осим уколико се неки други пут примене (нпр. дермално или инхалационо) не сматра прикладнијим.

Када је потребно, испитивана супстанца се раствара или суспендује у одговарајућем вехикулуму. Препоручује се да се, када год је могуће, користи водени раствор/суспензија, а затим да се размотри раствор/емулзија у уљу (нпр. кукурузно уље) и затим раствор у неком другом вехикулуму. За вехикулуме који нису вода морају бити познате токсичне карактеристике. Потребно је одредити стабилност испитиване супстанце у вехикулуму.

1.4.3. Дозирање

Користи се најмање три дозна нивоа и истовремена контрола. Осим уколико није ограничена физичком и хемијском природом или биолошким ефектима испитиване супстанце, бира се највећи дозни ниво са циљем да се изазове токсичност али не смрт или тешка патња. У случају неочекиване смртности, студија са стопом смртности од мање од 10% код родитељских (Р) животиња још увек је прихватљива. Опадајући низ дозних нивоа бира се тако да се покаже било какав ефекат повезан са дозирањем и нивоом доза при којима се не примећују штетни ефекти (NOAEL). Често су оптимални двоструки до четвороструких интервала за постављање опадајућих дозних нивоа, а додатак четврте експерименталне групе је често прихватљивији од коришћења врло великих интервала (нпр. више од фактора 10) између дозирања. За студије исхране интервали доза не смеју бити већи од троструких. Нивои доза се бирају узимајући у обзир било које постојеће податке о токсичности, посебно резултате из студија с поновљеним дозирањем. Узимају се у обзир било који расположиви подаци о метаболизму и кинетици испитиваног једињења или сличних материјала. Ови подаци помажу у показивању адекватности режима дозирања.

Контролна група је нетретирана група или група са вехикулумом уколико се он користи за примену испитиване супстанце. Осим третмана са испитиваном супстанцом, животиње у контролним групама се третирају на идентичан начин као и јединке из третираних група испитивања. Уколико се користи вехикулум, контролна група добија вехикулум у највећој запремини која се користи. Уколико се испитивана супстанца даје путем хране и узрокује смањено узимање или искористљивост хране, коришћење контролне групе за унос хране може се сматрати неопходним. Алтернативно, подаци из контролисаних студија намењених за оцењивање ефеката смањене потрошње хране на репродуктивне параметре користе се уместо истовремене контролне групе за унос хране.

Узимају се у обзир следеће карактеристике вехикулума и других адитива: ефекти на апсорпцију, расподелу, метаболизам или задржавање испитиване супстанце; ефекте на хемијска својства испитиване супстанце која могу изменити њена токсична својства и ефекте на потрошњу хране или воде, или на нутритивни статус животиња.

1.4.4. Испитивање граничне дозе

Уколико се у оралној студији при једном дозном нивоу од најмање 1.000 mg/kg ТМ/дан или, за примену путем хране или воде одговарајући проценат који се користи у поступку описаном у овој студији, не узрокује уочљиве токсичне ефекте код родитељских животиња или њиховог потомства, и ако се токсичност не може очекивати на основу података из структурно и/или метаболички сличних једињења, није неопходна цела студија уз коришћење неколико дозних нивоа. Примењује се испитивање граничне дозе, осим у случају кад изложеност људи указује на потребу за коришћењем виших нивоа оралне дозе. За друге начине примене као што су инхалација и дермална примена, физичка и хемијска својства испитиване супстанце, као што су растворљивост, често могу указати на границу највећег остварљивог нивоа излагања.

1.4.5. Примена доза

Животиње се дозирају испитиваном супстанцом седам дана у недељи. Препоручује се орална примена (храна, пиће или сонда). Уколико се користи неки други пут примене, то се оправдава и врше се потребне измене. Све животиње се дозирају на исти начин током одговарајућег периода испитивања. Кад се испитивана супстанца примењује сондом, примена се обавља путем трбушне цеви. Запремина примењене течности не сме прећи 1 ml/кг ТМ (0,4 ml/100 g ТМ највише за кукурузно уље), осим у случају водених раствора где се може користити 2 ml/100 g ТМ. Осим код иритабилних и корозивних супстанци које показују лошије ефекте у већим концентрацијама, варијабилност запремине која се примењује минимализује се прилагођавањем концентрације како би се обезбедила константна запремина при свим дозним нивоима. Код присилног храњења младунци примају експерименталну супстанцу кроз млеко, све док се не могу директно дозирати после одбијања од сисе. Када се супстанца примењује путем хране или воде за пиће, младунци додатно примају испитивану супстанцу чим почну самостално да се хране за време последње недеље периода лактације.

Код супстанце која се даје путем хране или воде за пиће, важно је обезбедити да количина примењене испитиване супстанце не утиче на баланс нормалне исхране или воде. Кад се испитивана супстанца даје путем хране, може се користити стална прехрамбена концентрација (ppm) или стални дозни ниво према телесној маси животиње. Алтернативне методе се образлажу. Уколико се супстанца даје присилно, доза се примењује у слично време сваког дана и прилагођена најмање недељно како би се одржао константни дозни ниво у односу на телесну масу животиње. Подаци о плаценталној расподели узимају се у обзир приликом прилагођавања присилне дозе засноване на телесној маси.

1.4.6. Експериментални распореди

Дневно дозирање родитељских (Р) мужјака и женки започиње се кад су стари пет до девет недеља. Дневно дозирање F_1 мужјака и женки започиње по одбијању од сисе. У случају примене испитиване супстанце путем хране или воде за пиће, директно излагање F_1 младунаца испитиваној супстанци може започети већ за време периода лактације. За оба пола (Р и F_1), дозирање се наставља најмање 10 недеља пре периода парења. Дозирање се наставља за оба пола за време двонедељног периода парења. Мушке јединке се лишавају живота на хуман начин и прегледају када више не буду потребне за оцењивање репродуктивних ефеката. За родитељске (Р) женке, дозирање се наставља током трудноће и све до одбијања од сисе F_1 потомака. Узимају се у обзир модификације у распореду дозирања на основу расположивих података о испитиваној супстанци, укључујући постојеће податке о токсичности, индукцији метаболизма или биоакумулацији. Доза за сваку животињу је заснована на најскоријим мерењима телесне масе. Обратити пажњу приликом прилагођавања дозе током последњег тромесечја трудноће.

Третирање Р и F_1 мужјака и женки наставља се до лишавања живота на хуман начин. Све Р и F_1 одрасли мужјаци и женке се лишавају живота на хуман начин када више нису потребни за процену репродуктивних ефеката. F_1 потомство које није одабрано за парење и читаво F_2 потомство лишава се живота на хуман начин после одбијања од сисе.

1.4.7. Поступак парења

1.4.7.1. Родитељско (Р) парење

За свако парење свака женка се смешта са једним мужјаком из истог дозног нивоа (1:1 парење) све док не дође до копулације или док не протекну две недеље. Женке се сваки дан прегледају на присутност сперме или вагиналног чепа. Нулти дан трудноће дефинише се као дан кад се пронађе сперма или вагинални чеп. У случају да парење није успешно, разматра се поновно парење женки са доказаним мужјацима из исте групе. Парови се јасно означавају у подацима. Парење сродних јединки се избегава.

1.4.7.2. F_1 парење

За парење F_1 потомства изабере се најмање један мужјак и једна женка при одбијању од сисе из сваког легла за парење са другим младунцима из истог дозног нивоа али из другог легла, како би се произвела F_2 генерација. Избор младунаца из сваког легла је случајан уколико се не уоче значајне разлике у телесној маси или изгледу између јединки у леглу. У случају да се такве разлике уоче, бирају се најбољи представници сваког легла. Ово се најбоље обавља на основу телесне масе али може бити погодније да се обави на основу изгледа. F_1 потомство се не пари све док не достигне пуну сексуалну зрелост.

Парови без потомака прегледају се како би се утврдио узрок неплодности. То може укључивати поступке као што су: додатне прилике за парење са другим доказаним јединкама, микроскопски преглед репродуктивних органа и испитивање еструс циклуса или сперматогенезе.

1.4.7.3. Друго парење

У неким случајевима, као што су промене у величини легла повезане са третманом или уочавање сумњивог ефекта за време првог парења, препоручује се да се Р или F_1 одрасле јединке поново паре како би се произвело друго легло. Препоручује се да се поновно паре мужјаци или женке које нису произвеле потомство с доказаним приплодним животињама супротног пола. Уколико се сматра да је друго легло неопходно у било којој генерацији, животиње се поновно паре приближно једну недељу после одбијања од сисе претходног легла.

1.4.7.4. Величина легла

Животињама се омогућава да имају нормална легла и да одгајају своје потомство до одбијања од сисе. Стандардизација величине легла није обавезна. Ако се изводи стандардизација, коришћена метода се детаљно описује.

1.5. ПОСМАТРАЊА

1.5.1. Клиничка посматрања

Сваког дана се обавља општа клиничка посматрања, а у случају присилног храњења његов временски распоред узима у обзир предвиђено време за појаву максималних ефеката после дозирања. Бележе се промене у понашању, знаци тешког или дуготрајног кођења и сви знаци токсичности. Детаљнији преглед сваке животиње обавља се најмање једном недељно и најбоље га је обављати приликом мерења телесне масе животиња. Два пута дневно, а током викенда једном дневно, кад одговара, све животиње се прегледају на морбидитет и смртност.

1.5.2. Телесна маса и конзумирање, хране/воде родитељских животиња

Телесна маса родитељских животиња (P и F_1) мери се првог дана дозирања и најмање једном недељно после тога. Телесна маса родитељских женки (P и F_1) мери се најмање нултог, седмог, четрнаестог, двадесетог или двадесет првог дана гестације, као и за време лактације у исте дане када се мери маса легла и на дан кад се животиње лишавају живота на хуман начин. Ова опажања се наводе појединачно за сваку одраслу животињу. Пре парења и у периоду гестације потрошња хране се мери најмање једном недељно. Унос воде мери се најмање једном недељно уколико се испитивана супстанца примењује путем воде.

1.5.3. Еструс циклус

Дужина и нормалност еструс циклуса оцењују се за P и F_1 женке вагиналним брисевима пре парења и по избору за време парења, док се не пронађу докази парења. Код добијања вагиналних/цервикалних ћелија, пази се како би се избегло надраживање (прекидање, пертурбација, поремећај) слузнице и потом изазивање лажне трудноће[1].

1.5.4. Параметри сперме

За све P и F_1 мужјаке приликом лишавања живота на хуман начин бележи се маса тестиса и епидидимиса и по један од органа се чува за хистопатолошки преглед (видети одељке 1.5.7. и 1.5.8.1. ове методе). Од подскупа од најмање десет мужјака из сваке групе P и F_1 мужјака преостали тестиси и епидидимиси се користе за пребројавање сперматида отпорних на хомогенизацију и резерве сперматозоида каудалног дела епидидимиса. Из исте подгрупе мужјака сперматозоиди из кауде епидидимидиса или vas deferens-а се прикупљају због оцењивања њихове мобилности и морфологије. Уколико се уоче ефекти у вези са третманом или када постоје докази о томе из других студија о могућим ефектима на сперматогенезу, оцењивање сперматозоида се обавља код свих мужјака у свакој дозној групи. У противном се бројање може ограничити на P и F_1 мужјаке из контролне и високодозне групе.

Броји се укупни број сперматида тестиса отпорних на хомогенизацију и сперматозоида каудалног дела епидидимиса[2, 3]. Каудалне резерве сперматозоида могу се извести из концентрације и запремине сперме у суспензији коришћеној за комплетирање квалитативних оцењивања и броја сперматозоида добијеног каснијим млевењем и/или хомогенизацином преосталог каудалног ткива. Бројање се обавља на одабраној подгрупи мужјака из свих дозних група одмах након лишавања живота на хуман начин, осим ако се не направе видео или дигитални снимци или ако се примерци не замрзну и анализирају касније. У тим случајевима контролне и групе великих доза прве се анализирају. Уколико се не уоче ефекти у вези са третманом (нпр. ефекти на број сперматозоида, покретљивост или морфологију), преостале групе се не анализирају. Када се такви ефекти уоче у групи високе дозе, онда се оцењују и групе нижих доза.

Покретљивост епидидималних (или ductus deferens) сперматозоида се оцењује или снима одмах након лишавања живота на хуман начин. Сперма се прибавља уз минималну штету и разблажује за анализу покретљивости коришћењем прихватљивих метода[4]. Проценат прогресивно покретљивих сперматозоида одређује се субјективно или објективно. Када се обавља компјутерска анализа покретљивости[5, 6, 7, 8, 9, 10] извођење прогресивне покретљивости се ослања на кориснички дефинисане граничне вредности за просечну брзину и правац путање или на линеарни индекс. Уколико су узорци снимљени[11] или уколико постоје слике забележене на другачији начин у тренутку обдукције, може се обавити каснија анализа P и F_1 мужјака само из контролне и групе с високом дозом, осим уколико се не уоче ефекти везани за третман. У том случају се анализирају и групе нижих доза. Уколико нема видео или дигиталног записа сви узорци у свим третираним групама се анализирају при постморталном прегледу.

Ради се морфолошка анализа узорка сперматозоида из епидидимидиса (или vas deferens-а). Сперматозоиди (најмање 200 по узорку) се анализирају као фиксирани, мокри препарат[12] и класификују као нормални или абнормални. Примери морфолошке абнормалности сперматозоида укључују фузију, изоловане главе и деформисане главе и/или репове. Оцењивање се обавља на одабраној подгрупи мужјака свих дозних група, било одмах након лишавања живота на хуман начин или касније на основу видео или дигиталних снимака. Једном фиксирани размази могу се читати и касније. У тим случајевима могу се прво анализирати контролне и групе високих доза.

Уколико се не уоче ефекти у вези са третманом (нпр. ефекти на морфологију сперматозоида), преостале групе није потребно анализирати. Када се такви ефекти уоче код групе високе дозе, онда се и групе нижих доза оцењују.

Уколико је било који од горе наведених параметара за оцењивање сперме већ испитан као део студије системске токсичности која траје најмање 90 дана, такве анализе није неопходно понављати у студији на две генерације. Препоручује се да се сачувају узорци или дигитални снимци сперме P генерације, како би се по потреби омогућила каснија анализа.

1.5.5. Потомство

Свако легло се прегледа што је могуће пре након кођења (дан лактације 0) како би се установио број и пол младунаца, мртворођени, живорођени и присутност већих аномалија. Младунци који су пронађени мртви на дан 0, уколико нису мацерирани, прегледају се како би се открили могући дефекти и узрок смрти и чувају се. Живи младунци се пребројавају и мери се телесна маса сваког појединачно, по рођењу (дан лактације 0) или на дан 1 и данима који су редовно предвиђени за мерење телесне масе, нпр. дани 4, 7, 14. и 21. дан лактације. Бележе се физичке или аномалије у понашању уочене на мајкама или потомству.

Физички развој потомства бележи се пре свега према добијању на телесној маси. Други физички параметри (нпр. отварање уха и ока, избијање зуба, раст длаке) могу дати додатне податке, али је ове податке најбоље оцењивати у контексту података о полном сазревању (нпр. старост и телесна маса приликом отварања вагине или балано-препуцијалне сепарације)[13]. Фукционална испитивања (нпр. моторике, сензорне функције, онтогеног рефлекса) F_1 потомства пре и/или после одбијања од сисе, посебно она везана уз полно сазревање препоручују се уколико нису укључена у посебне студије. Старост приликом сазревања вагине и препуцијалне сепарације утврђује се за F_1 младунце који се одбијају од сисе, а који су одабрани за парење. Аногенитално растојање се мери нултог постнаталног дана код F_2 младунаца уколико је изазвано алтерацијама у односу полова у F_1 или времену полног сазревања.

Функционална посматрања могу да се изоставе код група које на други начин показују јасне знаке штетних ефеката (нпр. значајно смањење у добијању на телесној маси, итд). Уколико се раде функционална истраживања, не изводе се на младунцима који су одабрани за парење.

1.5.6. Постмортални преглед

Приликом закључивања или смрти у току студије, све родитељске животиње (P и F_1), сви младунци са спољњим абнормалностима или клиничким знацима, као и једно случајно одабрано младунче по полу по леглу из F_1 и F_2 генерације макроскопски се прегледа како би се уочиле било какве структурне абнормалности или патолошке промене. Посвећује се посебна пажња органима репродуктивног система. Младунци нађени на самрти па хумано лишени живота и мртва младунчад, када нису мацерирана, испитују се на могуће дефекте и/или узрок смрти и чувају.

Материце свих женки које су једном рађале прегледају се на присуство и број имплантационих места на начин који не компромитује хистопатолошко оцењивање.

1.5.7. Мерење масе органа

Приликом закључивања утврђује се телесна маса и маса следећих органа за све P и F_1 родитељске животиње (парни органи се мере индивидуално):

– материца, јајници;

– тестиси, епидидимидис (укупно и кауда);

– простата;

– семене кесице са коагулационим жлездама и њихове течности и простата (као једна јединица);

– мозак, јетра, бубрези, слезина, хипофиза, тироидна и адреналне жлезде и познати циљни органи.

Утврђује се терминална телесна маса заF1иF2младунце који су одабрани за обдукцију. Мере се следећи органи од једног случајно одабраног младунца по полу по леглу (видети одељак 1.5.6. ове методе): мозак, слезина и тимус.

Резултати обдукције и мерења масе органа процењују се у контексту са запажањима из других студија са поновљеним дозама, када је изводљиво.

1.5.8. Хистопатолошка испитивања

1.5.8.1. Родитељске животиње

Следећи органи и ткива родитељских (P и F_1) животиња или репрезентативни узорци истих се фиксирају и чувају у одговарајућем медијуму за хистопатолошку анализу:

– вагина, материца са цервиксом и јајници (сачувани у одговарајућем фиксативу);

– један тестис (сачуван у Bouin-овом или сличном фиксативу), један епидидимис, семене кесице, простата и коагулациона жлезда;

– претходно идентификовани циљни органи од свих P и F_1 животиња одабраних за парење.

Потпуна хистопатолошка испитивања горе наведених сачуваних органа обављају се за све јединке из групе којој је давана висока доза и контролне групе P и F_1 животиња изабраних за парење. Испитивање јајника P животиња је опционално. Органи који показују промене везане за третман испитују се у групама ниске и средње дозе како би се помогло одређивање NOAEL. Репродуктивни органи животиња у групама с ниским и средње високим дозама за које се сумња на смањену плодност, нпр. оних које се нису париле, које нису зачеле, изнеле или родиле здраво потомство или на чији је еструс циклус, број сперматозоида, мобилност или морфологију било утицаја, подвргавају се хистопатолошком оцењивању. Испитују се сва већа оштећења као што су атрофија или тумори.

Обавља се детаљан хистопатолошки преглед тестиса (нпр. коришћењем Bouinovog фиксатива, учвршћивањем парафином и попречним пресецима дебљине 4 μм до 5 μм) како би се идентификовали ефекти везани за третман као што су задржане сперматиде, слојеви или типови герминативних ћелија који недостају, дивовске ћелије са више једара или отпадање сперматогених ћелија у лумен[14]. Преглед интактног епидидимиса укључује преглед главе, тела и репа што се може постићи анализом уздужних пресека. Епидидимис се прегледа на инфилтрацију леукоцита, промене у преовлађујућим типовима ћелија, ненормалне типове ћелија и фагоцитозу сперматозоида. Бојење PAS-ом и хематоксилином се користи за преглед мушких репродуктивних органа.

Постлактациони јајник садржи примордијалне и растуће фоликуле као и велика жута тела лактације. Хистопатолошки преглед открива квалитативно смањење популације примордијалних фоликула. Обавља се квантитативна анализа примордијалних фоликула за F_1 женке; број животиња, избор пресека јајника и величина узорка пресека су статистички одговарајући за поступак оцењивања који се користи. Преглед укључује пребројавање примордијалних фоликула који могу бити комбиновани са малим растућим фоликулама због поређења третираних и контролних јајника[15, 16, 17, 18, 19].

1.5.8.2. Младунци одбијени од сисања

Изузетно, ненормално ткиво и циљани органи свих младунаца са спољним абнормалностима или клиничким знацима, као и они органи од случајно одабраног младунаца по полу по леглу из обе F_1 и F_2 генерације, који нису одабрани за парење биће фиксирани и чувани у одговарајућем медијуму за хистопатолошки преглед. Пуна хистопатолошка карактеризација сачуваног ткива обавља се уз посебан нагласак на органе репродуктивног система.

2. ПОДАЦИ

2.1. ОБРАДА РЕЗУЛТАТА

Подаци се наводе појединачно и табеларно. Наводе се подаци за сваку експерименталну групу и сваку генерацију и то: број животиња на почетку испитивања, број животиња које су пронађене мртве за време испитивања или лишене живота на хуман начин, време било које смрти или лишавања живота на хуман начин, број плодних животиња, број гравидних женки, број животиња које показују знаке токсичности, опис уочених знакова токсичности, укључујући, време настанка, трајање и озбиљност токсичних ефеката, типове запажања код родитеља и потомства, типове хистопатолошких промена и све релевантне податке о леглу.

Нумерички резултати се оцењују одговарајућом општеприхваћеном статистичком методом. Статистичке методе се бирају приликом конципирања студије и треба их оправдати. Статистички модели доза-одговор могу бити корисни за анализу података. Извештај укључује довољно података о методи анализе и о примењеном компјутерском програму како би независни оцењивач/статистичар могао поновно да процени и реконструише анализу.

2.2. ОЦЕЊИВАЊЕ РЕЗУЛТАТА

Налази ове студије токсичности по репродукцију на две генерације оцењују се у смислу уочених ефеката укључујући обдукционе и микроскопске налазе. Оцењивање укључује везу или непостојање везе између дозе испитиване супстанце и присуства или одсуства појаве и озбиљности абнормалности, укључујући већа оштећења, идентификоване циљне органе, ефект на плодност, клиничке абнормалности, ефект на репродукцију и на легла, промене телесне масе, ефекте на смртност и све друге токсичне ефекте. Приликом оцењивања резултата испитивања узимају се у обзир физичка и хемијска својства испитиване супстанце и када су доступни токсикокинетичке податке.

Правилно изведено испитивање токсичности по репродукцију обезбеђује задовољавајућу процену нивоа без ефекта и разумевање штетних ефеката на репродукцију, рађање, лактацију, постнатални раст и развој, укључујући раст и полни развој.

2.3. ТУМАЧЕЊЕ РЕЗУЛТАТА

Испитивање токсичности по репродукцију на две генерације даје податке о ефектима поновљеног излагања супстанци за време свих фаза репродуктивног циклуса. Студија даје податке о репродуктивним параметрима и о развоју, расту, сазревању и преживљавању потомства. Резултати студије тумаче се заједно са налазима субхроничких студија, испитивања пренаталног раста и развоја, токсикокинетичких и других расположивих студија. Резултати ове студије могу се користити у процени потребе за даљим испитивањем хемикалије. Екстраполација резултата студије на човека је прихватљива до одређеног степена. Најбоље је да се користе за обезбеђивање података о нивоу без ефекта и за дозвољено излагање људи[20, 21, 22, 23].

3. ИЗВЕШТАЈ

Извештај о испитивању, уколико је могуће, садржи податке о:

1) Испитиваној супстанци:

– физичка природа и, ако је релевантно, физичка и хемијска својства;

– идентификациони подаци;

– чистоћа.

2) Вехикулуму (ако одговара):

– оправдање за избор вехикулума ако није у питању вода.

3) Експерименталним животињама:

– коришћена врста/соој;

– број, старост и пол животиња;

– извор, услови смештаја, исхрана, материјал за гнежђење, итд.;

– индивидуална тежина животиња на почетку испитивања;

4) Условима испитивања:

– образложење избора нивоа дозе;

– детаљи о испитиваној супстанци формулација/припрема хране, постигнуте концентрације;

– стабилност и хомогеност препарата;

– детаљи о примени испитиване супстанце;

– прерачунавање из концентрације испитиване супстанце у храни/води за пиће (ppm) до постигнуте дозе (mg/kg телесна маса/дан), ако је примењиво;

– подаци о квалитету хране и воде.

5) Резултатима:

– потрошња хране и воде, ако је доступно, искоришћење хране (добијање на телесној маси по граму конзумиране хране) и потрошња испитиваног материјала за P и F_1 животиње, осим за период кохабитације и за последњу трећину периода лактације;

– подаци о апсорпцији (ако су доступни);

– подаци о телесној маси за P и F_1 животиње које су изабране за парење;

– подаци о маси легла и младунаца;

– телесна маса при лишавању живота на хуман начин и апсолутна и релативна маса органа за родитељске животиње;

– природа, озбиљност и трајање клиничких запажања (било да су реверзибилни или не);

– време смрти током студије или да ли су животиње преживеле до лишавања живота на хуман начин;

– подаци о токсичким реакцијама по полу и дози, укључујући индексе парења, плодности, гестације, рођења, одрживости и лактације; у извештају се наводе бројеви коришћени за израчунавање ових индекса;

– токсични и други ефекти на репродукцију, потомство, постнатални раст, итд.;

– налази обдукције;

– детаљан опис свих хистопатолошких налаза;

– број P и F_1 животиња са нормалним циклусом и трајање циклуса;

– укупни број сперматозоида кауде епидидимис, проценат прогресивно покретљивих сперматозоида, проценат морфолошки нормалних сперматозоида и проценат сперматозоида са сваком идентификованом абнормалношћу;

– време до парења, укључујући број дана до парења;

– трајање гестације;

– број имплантација, жутих тела, величина легла;

– број живорођених и пост-имплантациони губитак;

– број младунаца са већим видљивим абнормалностима, уколико је одређен наводи се број кржљаваца;

– подаци о физичким обележјима код младунаца и други подаци о постнаталном расту и развоју; проучена физичка обележја се оправдавају;

– подаци о функционалним запажањима код младунаца и одраслих јединки, ако је примењиво;

– статистичка анализа резултата, кад одговара.

6) Образложењу резултата.

7) Закључцима, укључујући NOAEL вредности за ефекте на мајку и потомство.

4. ЛИТЕРАТУРА

1. Sadleir, R.M.F.S. (1979). Cycles and Seasons, In: Reproduction in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization, C.R. Auston and R.V. Short (eds.), Cambridge, New York.

2. Gray, L.E. et al., (1989). A Dose-Response Analysis of Methoxychlor-Induced Alterations of Reproductive Development and Function in the Rat. Fundamental and Applied Toxicology 12:92-108.

3. Robb, G.W. et al., (1978). Daily Sperm Production and Epididymal Sperm Reserves of Pubertal and Adult Rats. Journal of Reproduction and Fertility 54:103-107.

4. Klinefelter, G.R. et al., (1991). The Method of Sperm Collection Significantly Influences Sperm Motion Parameters Following Ethane Dimethanesulfonate Administration in the Rat. Reproductive Toxicology 5:39 44

5. Seed, J. et al. (1996). Methods for Assessing Sperm Motility, Morphology, and Counts in the Rat, Rabbit, and Dog: a Consensus Report. Reproductive Toxicology 10(3):237- 244.

6. Chapin, R.E. et al., (1992).Methods for Assessing Rat Sperm Motility. Reproductive Toxicology 6:267- 273

7. Klinefelter, G.R. et al., (1992). Direct Effects of Ethane Dimethanesulphonate on Epididymal Function in Adult Rats: an *In vitro* Demonstration. Journal of Andrology 13:409-421.

8. Slott, V.L. et al., (1991). Rat Sperm Motility Analysis: Methodologic Considerations. Reproductive Toxicology 5:449-458.

9. Slott, V.L. and Perreault, S.D., (1993). Computer-Assisted Sperm Analysis of Rodent Epididymal Sperm Motility Using the Hamilton-Thorn Motility Analyzer. In: Methods in Toxicology, Part A., Academic, Orlando, Florida. pp. 319-333.

10. Toth, G.P. et al. (1989). The Automated Analysis of Rat Sperm Motility Following Subchronic Epichlorhydrin Administration: Methodologic and Statistical Considerations. Journal of Andrology 10: 401-415.

11. Working, P.K. and M. Hurtt, (1987). Computerized Videomicrographic Analysis of Rat Sperm Motility. Journal of Andrology 8:330-337.

12. Linder, R.E. et al., (1992). Endpoints of Spermatoxicity in the Rat After Short Duration Exposures to Fourteen Reproductive Toxicants. Reproductive Toxicology 6:491-505.

13. Korenbrot, C.C. et al., (1977). Preputial Separation as an External Sign of Pubertal Development in the Male Rat. Biological Reproduction 17:298303.

14. Russell, L.D. et al., (1990). Histological and Histopathological Evaluation of the Testis, Cache River Press, Clearwater, Florida.

15. Heindel, J.J. and R.E. Chapin, (eds.) (1993). Part B. Female Reproductive Systems, Methods in Toxicology, Academic, Orlando, Florida.

16. Heindel, J.J. et al., (1989) Histological Assessment of Ovarian Follicle Number in Mice As a Screen of Ovarian Toxicity. In: Growth Factors and the Ovary, A.N. Hirshfield (ed.), Plenum, New York, pp. 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 C.D. 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. ТОКСИКОКИНЕТИКА

1. МЕТОДА ИСПИТИВАЊА

1.1. УВОД

Видети Општи увод.

1.2. ДЕФИНИЦИЈЕ

Видети Општи увод.

1.3. РЕФЕРЕНТНЕ СУПСТАНЦЕ

Нису прописане.

1.4. ПРИНЦИП МЕТОДЕ

Супстанца која се испитује примењује се одговарајућим путем. Зависно од сврхе студије, супстанца може да се даје као појединачна или у поновљеној дози током одређеног периода, једној или више група експерименталних животиња. После тога, зависно од типа испитивања одређује се супстанца и/или метаболити у телесним течностима, ткивима и/или екскретима.

Студија може да се обави са „необележеним" или „обележеним" облицима супстанце која се испитује. Кад се користи

ознака, она се налази у супстанци на таквом месту да се обезбеди што је могуће више података о судбини једињења.

1.5. КРИТЕРИЈУМИ КВАЛИТЕТА

Нису прописани.

1.6. ОПИС МЕТОДЕ

1.6.1. Припреме

Здраве младе одрасле животиње аклиматизују се на лабораторијске услове најмање пет дана пре обављања испитивања. Пре испитивања животиње се случајним избором сврставају у групе за третирање. У посебним случајевима могу се користити и врло младе, гравидне или претходно третиране животиње.

1.6.2. Експериментални услови

1.6.2.1. Експериментalне животиње

Токсикокинетичка испитивања могу да се изводе на једној или више одговарајућих животињских врста. Узимају се у обзир врсте које су коришћене и које ће се користити у другим студијама токсичности исте испитиване супстанце. Кад се у испитивању користе глодари, варијација телесне масе не сме да прелази ± 20% средње телесне масе.

1.6.2.2. Број и пол

На почетку, за испитивања апсорпције и излучивања, користи се четири животиње у свакој дозној групи. Није обавезан избор једног одређеног пола, али под одређеним условима потребно је испитивање оба пола. Уколико постоје разлике у одговору између полова, потребно је испитати по четири животиње сваког пола. У случају испитивања са врстама које нису глодари, може да се користи мањи број животиња. Када се испитује расподела у ткивима, на почетку, приликом одређивања величине групе, узима се у обзир број животиња које ће се лишити живота на хуман начин у свакој временској инстанци (тачки) и број временских инстанци који се испитује.

Код испитивања метаболизма величина групе зависи од потреба студије. Код испитивања вишеструких доза или вишеструких временских инстанци, величина групе зависи од броја временских тачака и од планираних лишавања живота на хуман начин, али не сме да буде мања од две животиње. Величина групе је довољна да обезбеди прихватљиву карактеризацију ресорпције, платоа и елиминације (ако одговара) супстанце која се испитује и/или метаболита.

1.6.2.3. Дозни нивои

У случају примене појединачне дозе користе се најмање два нивоа доза: ниска доза без токсичног ефекта и висока доза при којој се могу појавити промене у токсикокинетичким параметрима или при којој се јављају токсични ефекти.

У случају примене поновљеног дозирања обично је довољна ниска доза, али под одређеним условима висока доза може да буде неопходна.

1.6.2.4. Пут примене

У токсикокинетичким студијама се користи исти пут и, када одговара, исти вехикулум као што се користи или ће бити коришћен у другим студијама токсичности. Испитивана супстанца се даје групама експерименталних животиња орално присилним давањем или у храни, наноси се на кожу или примењује инхалацијом током одређених временских периода. Интравенска примена испитиване супстанце може да буде корисна за утврђење релативне апсорпције када се супстанца примењује другим путевима. Одмах након интравенског давања супстанце добијају се корисни подаци о начину расподеле.

Узима се у обзир могућност интерференције вехикулума са испитиваном супстанцом. Потребно је посветити пажњу разликама у апсорпцији између примене испитиване супстанце присилним давањем и у храни и потребе за тачним (прецизним) одређивањем дозе, посебно кад се супстанца даје путем хране.

1.6.2.5. Период посматрања

Све животиње се свакодневно посматрају. Свакодневно се бележе знаци токсичности и други релевантни клинички знаци, укључујући време њиховог наступања, степен и трајање.

1.6.3. Поступак

После мерења телесне масе, животињама се одговарајућим путем примењује супстанца која се испитује. Ако је релевантно, животиње се стављају на гладовање пре примене супстанце која се испитује.

1.6.3.1. Апсорпција

Брзина и степен апсорпције примењене супстанце могу се одредити коришћењем различитих метода, са и без референтних група[XIII], на пример:

– одређивањем количине испитиване супстанце и/или метаболита у екскретима, као што су урин, жуч, столица, издахнути ваздух и у остацима мртвих животиња;

– поређењем биолошких реакција (тј. студије акутне токсичности) између третираних група и контролних и/или референтних група;

– упоређењем количине супстанце која је излучена путем бубрега и/или метаболита код третираних и референтних група;

– одређивањем површине испод криве концентрација у плазми/време између супстанце и/или метаболита и поређењу са подацима добијеним од референтне групе.

_____

XIII У овој методи референтна група је она код које је супстанца која се испитује примењена другим путем који омогућује потпуну биорасположивост дозе.

1.6.3.2. Расподела

Постоје два приступа, од којих се један или оба могу користити за анализу облика расподеле:

– корисни квалитативни подаци добијају се коришћењем ауторадиографских техника на целом телу;

– квантитативни подаци добијају се лишавања живота на хуман начин у различито време после експозиције и одређивања концентрације и количине испитиване супстанце и/или метаболита у ткивима и органима.

1.6.3.3. Излучивање

Код испитивања излучивања скупљају се мокраћа, столица и издахнути ваздух, а у неким случајевима и жуч. Количина испитиване супстанце и/или метаболита у тим излучевинама мери се више пута после излагања или док се око 95% примењене дозе не излучи или током седам дана (уколико излучивање 95% дозе траје дуже).

У посебним случајевима се узима у обзир излучивање испитиване супстанце у млеку експерименталних животиња које доје.

1.6.3.4. Метаболизам

Погодним техникама анализирају се биолошки узорци да би се утврдио степен и тип метаболизма. Уколико је потребно дати одговоре на питања која су произашла из претходних токсиколошких студија, потребно је разјаснити структуру метаболита и предложити одговарајуће метаболичке путеве. Корисно је обавити *in vitro* испитивање како би се добили подаци о метаболичким путевима.

Додатни подаци о односу метаболизма и токсичности могу се добити биохемијским студијама, као што је одређивање ефеката на системе ензима који учествују у метаболизму, смањење ендогених непротеинских сулфидрилних једињења и везивање супстанце за макромолекуле.

2. ПОДАЦИ

Подаци се наводе табеларно, у складу са типом изведене студије, а где је потребно, даје се и графичка презентација. За сваку експерименталну групу наводи се средња вредност и статистичке варијације мерења у односу на време, дозирање, ткива и органе, када одговара. Потребно је одредити степен апсорпције и количину и брзине излучивања одговарајућим методама. Када се обављају испитивања метаболизма, наводи се структура утврђених метаболита и могући метаболички пут.

3. ИЗВЕШТАЈ

3.1. ИЗВЕШТАЈ О ИСПИТИВАЊУ

У складу са типом изведеног испитивања, извештај о испитивању, ако је могуће, садржи податке о:

– врсти, соју, извору, условима средине, исхрани;

– карактеризацији обележених материјала, ако су употребљени;

– нивоима доза и интервалима давања;

– путу примене и, ако је коришћен, о вехикулуму;

– токсичним и другим уоченим ефектима;

– методи одређивања испитиване супстанце и/или метаболита у биолошким узорцима, укључујући издахнути ваздух;

– табеле мерења по полу, дози, режиму, времену, ткивима и органима;

– приказ степена апсорпције и излучивања током времена;

– методи за карактеризацију и идентификацију метаболита у биолошким узорцима;

– методи биолошких мерења у вези са метаболизмом;

– предложеним путевима метаболизма;

– образложењу резултата;

– тумачењу резултата.

3.2. ПРОЦЕНА И ТУМАЧЕЊЕ РЕЗУЛТАТА

Видети Општи увод.

4. ЛИТЕРАТУРА

Видети Општи увод.

B.37. ОДЛОЖЕНА НЕУРОТОКСИЧНОСТ ОРГАНОФОСФОРНИХ СУПСТАНЦИ ПОСЛЕ АКУТНОГ ИЗЛАГАЊА

1. МЕТОДА ИСПИТИВАЊА

1.1. УВОД

У процени и евалуацији токсичних ефеката супстанци важно је узети у обзир потенцијал посебних група супстанци да узрокују специфичне врсте неуротоксичности које не морају да буду откривене у другим студијама токсичности. Уочено је да одређене органофосфорне супстанце узрокују одложену неуротоксичност и сматрају се кандидатима за оцењивање.

За идентификацију супстанци које могу да узрокују одложену полинеуропатију могу се применити *in vitro* скрининг тестови. Негативни резултати *in vitro* студија не дају доказе да испитивана супстанца није неуротоксична.

Видети Општи увод.

1.2. ДЕФИНИЦИЈЕ

Органофосфорне супстанце укључују нејонизоване органофосфорне естре, тиоестере или анхидриде органофосфорне, органофосфорасте или органофосфамидне киселине или сличне тиофосфорној, тиофосфорастој или тиофосфамидној киселини или друге супстанце које могу да узрокују одложену неуротоксичност која се понекад јавља код ових група супстанци.

Одложена неуротоксичност јесте синдром који се повезује са продуженим одложеним наступањем атаксије, дисталне аксонопатије у кичменој мождини и периферним живцима и инхибицијом и старењем циљне естеразе неуропатије (у даљем тексту: NTE) у нервном ткиву.

1.3. РЕФЕРЕНТНЕ СУПСТАНЦЕ

Референтне супстанце могу да се испитују са позитивном контролном групом као средство које показује да се под лабораторијским условима одговор испитиваних животињских врста није значајно променио.

Пример широко коришћене неуротоксичне супстанце је три-о-толил фосфат (CAS 78-30-8, EINECS 201-103-5, CAS номенклатура: трис (2-метилфенил)естар фосфорне киселине, такође познат као трис-о-крезилфосфат.

1.4. ПРИНЦИП МЕТОДЕ

Испитивана супстанца примењује се орално у једној дози домаћим кокошкама које су заштићене од акутних холинергичких ефеката, када одговара. Животиње се посматрају 21 дан како би се уочиле абнормалности у понашању, атаксија и парализа. На кокошкама насумично изабраним из сваке групе изводе се биохемијска мерења, посебно NTE, обично 24 и 48 сата после дозирања. Двадесет и један дан после излагања преостале кокошке се лишавају живота на хуман начин и изводе се хистопатолошки преглед одабраних нервних ткива.

1.5. ОПИС МЕТОДЕ

1.5.1. Припреме

Здраве младе кокошке без вирусних болести које могу да интерферирају, које не примају лекове и без абнормалности случајним избором се уврштују у третиране и контролне групе и аклиматизују на лабораторијске услове најмање пет дана пре почетка студије.

Користе се кавези или затворени простори који су довољно велики за слободно кретање и лако посматрање хода.

Дозирање испитиване супстанце обично је оралним путем присилним храњењем, гел капсулама или сличном методом. Течности се дају неразблажене или растворене у одговарајућем вехикулуму као што је кукурузно уље. Чврсте супстанце се, ако је могуће, растварају, јер велике дозе чврстих супстанци у гел капсулама не могу ефикасно да се апсорбују. За вехикулуме различите од воде морају бити познате токсичне карактеристике, а уколико нису познате, исте се одређују пре испитивања.

1.5.2. Услови испитивања

1.5.2.1. Експериментalне животиње

Препоручује се млада одрасла домаћа кокошка (Gallus gallus domestícus), стара 8 до 12 месеци. Користе се врсте и сојеве стандардне величине. Кокошке се гаје у условима који им омогућавају слободно кретање.

1.5.2.2. Број и пол

Поред третиране групе користи се контролна група вехикулума и група позитивне контроле. Са контролном групом

вехикулума поступа се исто као и са третираном групом, осим што се изоставља примена испитиване супстанце.

Користи се довољан број кокошки у свакој групи како би се омогућило лишавања живота на хуман начин најмање шест птица за биохемијска одређивања (по три у свакој од две временске тачке) и да шест птица може да преживи 21-дневни период праћења после третмана за патологију.

Група позитивне контроле може да се води истовремено или то може да буде недавна контролна група из раније студије. Она садржи најмање шест кокошки третираних с познатим неуротоксикантом са одложеним дејством: три кокоши за биохемију и три за патологију. Препоручљиво је периодично ажурирање података из раније студије. Нови подаци позитивне контроле развијају се кад лабораторија која изводи испитивање промени неки основни елемент (нпр. сој, храна, услови смештаја).

1.5.2.3. Дозни нивои

Обавља се прелиминарна студија уз коришћење одговарајућег броја кокошки и група дозних нивоа како би се утврдио ниво који ће се користити у главној студији. Одређена смртност је неопходна у овој прелиминарној студији како би се дефинисала адекватна доза за главну студију. Може се користити атропин или други заштитни агенс за који се зна да не утиче на одложене неуротоксичне ефекте да би се спречила смрт због акутних холинергичких ефеката. Могу се користити различите експерименталне методе како би се проценила максимална доза испитиваних супстанци која не изазива смрт (видети методу B.1*bis* која је дата у овом прилогу). Ранији подаци о кокошки или други токсиколошки подаци такође могу бити корисни у избору дозе.

Дозни ниво испитиване супстанце у главној студији је највећи могући узимајући у обзир резултате студије прелиминарног избора дозе и горњу границу дозе од 2.000 mg/kg ТМ. Било која смртност до које може доћи не омета преживљавање довољног броја животиња за биохемијска (шест) и хистолошка (шест) испитивања после 21 дана. Користе се атропин или други заштитни агенс за који се зна да не утиче на одложене неуротоксичне ефекте како би се спречила смрт услед акутних холинергичких ефеката.

1.5.2.4. Испитивање граничне дозе

Уколико испитивање при дозном нивоу од најмање 2.000 mg/kg ТМ/дан, коришћењем поступака описаних у овој студији, не покаже никакве токсичне ефекте и уколико се токсичност не очекује на основу података о структурно сличним супстанцама, није неопходна студија која користи веће дозе. Испитивање граничне дозе се не примењује када људско излагање указује на потребу за коришћењем вишег нивоа дозе.

1.5.2.5. Период посматрања

Период посматрања је 21 дан.

1.5.3. Поступак

После примене заштитног агенса како би се спречила смрт због акутних холинергичких ефеката, испитивана супстанца даје се у једној дози.

1.5.3.1. Општа посматрања

Посматрања се започињу одмах по излагању. Све кокошке се пажљиво прегледају неколико пута током прва два дана, а после тога најмање једном дневно у периоду од 21 дан или до предвиђеног лишавања живота на хуман начин. Бележе се све знаци токсичности, укључујући време настанка, врсту, озбиљност и трајање абнормалности понашања. Атаксија се мери ординалном скалом за оцењивање која се састоји од најмање четири нивоа, а парализа се региструје. Најмање два пута недељно кокошке одабране за патолошка испитивања ваде се из кавеза и излажу присилној моторичкој активности одређени период, као што је пењање по мердевинама, како би се запазили минимални токсични ефекти. Животиње на самрти и животиње које трпе озбиљан стрес или бол уклањају се када се ове појаве примете, лишавају их живота на хуман начин и постмортално прегледају.

1.5.3.2. Телесна маса

Пре примене испитиване супстанце мери се телесна маса свим кокошкама, а после тога најмање једном недељно.

1.5.3.3. Биохемијска испитивања

Шест случајно изабраних кокошки из сваке третиране и контролне групе вехикулума и три кокошке из групе позитивне контроле (кад се таква група истовремено води) лишавају се живота на хуман начин у неколико дана после дозирања. Осим тога, припрема се и испитује мозак и лумбална кичмена мождина на инхибицију активности циљне естеразе неуропатије. Може да буде корисно да се припреми и испита ткиво ишијадичног нерва на инхибицију активности циљне естеразе неуропатије. Обично, три птице из контролне и сваке третиране групе лишавају се живота на хуман начин се после 24 сата и три птице после 48 сати, при чему се три кокошке из групе позитивне контроле лишавају живота после 24 сата. Уколико опажање клиничких знакова интоксикације (ово често може бити процењено посматрањем тренутка наступа холинергичких знакова) показује да се токсични агенс дистрибуира врло полако, може бити пожељно узорковати ткиво из три птице у оба наврата између 24 сата и 72 сата после дозирања.

Анализа ацетилхолинестеразе (у даљем тексту: AChE) може да се обави на тим узорцима, ако се то сматра одговарајућим. Може да се догоди *in vivo* спонтана реактивација AChE и да доведе до подцењивања потентности супстанце као AChE инхибитора.

1.5.3.4. Постмортални преглед

Постмортални преглед свих животиња (планирано лишених живота на хуман начин или лишених живота на самрти) укључује посматрање изгледа мозга и кичмене мождине.

1.5.3.5. Хистопатолошка испитивања

Нервно ткиво животиња које преживе период посматрања и које се не користи за биохемијске студије подвргава се микроскопском прегледу. Ткива се фиксирају in situ, коришћењем техника перфузије. Пресеци укључују мали мозак (средњи лонгитудинални ниво), продужену мождину, кичмену мождину и периферне живце. Пресеци кичмене мождине се узимају из горњег цервикалног сегмента, средње торакалоне и лумбо-сакралне регије. Узимају се пресеци дисталне регије тибијалног живца и његових грана до гастрокнемијусног мишића и скијатичног живца. Пресеци се боје одговарајућим мијелин и аксон-специфичним бојама.

2. ПОДАЦИ

Негативни резултати ефеката изабраних за посматрање у овој методи (биохемијска, хистопатолошка испитивања и посматрање понашања) не захтевају даље испитивање одложене неуротоксичности. Двосмислени или неуверљиви резултати за ове ефекте могу захтевати даље оцењивање.

Наводе се појединачни подаци. Сви подаци наводе се табеларно. За сваку експерименталну групу наводи се: број животиња на почетку испитивања, број животиња које показују оштећења, бихевиоралне или биохемијске ефекте, типови и озбиљност тих оштећења или ефеката и проценат животиња које показују сваки тип и озбиљност оштећења или ефекта.

Налазе ове студије се оцењује у смислу инциденце, озбиљности и корелације бихевиоралних, биохемијских и хистопатолошких ефеката и других опажених ефеката у третираним и контролним групама.

Нумеричке резултате се оцењују одговарајућим и прихваћеним статистичким методама. Статистичке методе се бирају приликом осмишљавања студије.

3. ИЗВЕШТАЈ

Извештај о испитивању, уколико је могуће, садржи податке о:

1) Експерименталним животињама:

– коришћени сој;

– број и старост животиња;

– извор, услови смештаја, итд.;

– индивидуалне телесне масе животиња на почетку испитивања.

2) Условима испитивања:

– детаљи о препарату испитиване супстанце, стабилност и хомогеност, кад одговара;

– оправдање избора вехикулума;

– детаљи о примени испитиване супстанце;

– детаљи о квалитету хране и воде;

– образложење избора дозе;

– спецификација примењених доза укључујући детаље о вехикулуму, запремини и физичком облику примењеног материјала;

– идентитет и детаљи о примени сваког заштитног агенса.

3) Резултатима:

– подаци о телесној маси;

– подаци о токсичном одговору по групи, укључујући морталитет;

– природа, озбиљност и трајање клиничких запажања (било да су реверзибилни или не);

– детаљан опис биохемијских метода и налаза;

– налази обдукције;

– детаљан опис свих хистопатолошких налаза;

– статистичка обрада резултата, када одговара.

4) Образложењу резултата.

5) Закључцима.

B.38. ИСПИТИВАЊЕ ОДЛОЖЕНЕ НЕУРОТОКСИЧНОСТИ ОРГАНОФОСФОРНИХ СУПСТАНЦИ – ПОНОВЉЕНЕ ДОЗЕ, 28 ДАНА

1. МЕТОДА ИСПИТИВАЊА

1.1. УВОД

У процени и евалуацији токсичних ефеката супстанци важно је узети у обзир потенцијал посебних група супстанци да узрокују специфичне врсте неуротоксичности које не морају да буду откривене у другим студијама токсичности. Уочено је да одређене органофосфорне супстанце узрокују одложену неуротоксичност и сматрају се кандидатима за оцењивање.

За идентификацију супстанци које могу да узрокују одложену полинеуропатију могу се применити *in vitro* скрининг тестови. Негативни резултати *in vitro* студија не дају доказе да испитивана супстанца није неуротоксична.

Ово 28-дневно испитивање одложене неуротоксичности даје податке о могућим ризицима по здравље који могу произаћи из поновљеног излагања током ограниченог временског периода. Испитивање обезбеђује податке о дози-ефекту и може дати процену дозе без ефекта која може да буде корисна при утврђивању критеријума безбедности за експозицију.

Видети Општи увод.

1.2. ДЕФИНИЦИЈЕ

Органофосфорне супстанце укључују нејонизоване органофосфорне естре, тиоестере или анхидриде органофосфорне, органофосфорасте или органофосфамидне киселине или сличне тиофосфорној, тиофосфорастој или тиофосфамидној киселини или друге супстанце које могу да узрокују одложену неуротоксичност која се понекад јавља код ових група супстанци.

Одложена неуротоксичност јесте синдром који се повезује са продуженим одложеним наступањем атаксије, дисталне аксонопатије у кичменој мождини и периферним живцима и инхибицијом и старењем циљне естеразе неуропатије (у даљем тексту: NTE) у нервном ткиву.

1.3. ПРИНЦИП МЕТОДЕ

Дневне дозе испитиване супстанце примењују се орално домаћим кокошкама током 28 дана. Животиње се најмање једном дневно посматрају због абнормалности у понашању, атаксије и парализе и то до 14 дана после задње дозе. Обављају се биохемијска мерења, посебно NTE на случајно одабраним кокошкама из сваке групе, обично 24 и 48 сата после последње дозе. Две недеље после задње дозе преостале кокошке се лишавају живота на хуман начин и обавља се хистопатолошки преглед одабраних нервних ткива.

1.4. ОПИС МЕТОДЕ

1.4.1. Припреме

Најмање пет дана пре почетка студије здраве младе кокошке без вирусних болести које могу да интерферирају, које не примају лекове и без абнормалности случајним избором се уврштују у третиране и контролне групе и аклиматизују на лабораторијске услове.

Користе се кавези или затворени простори који су довољно велики за слободно кретање и лако посматрање хода.

Дозирање испитиване супстанце је оралним путем седам дана у недељи присилним храњењем, гел капсулама или сличном методом. Течности се дају неразблажене или растворене у одговарајућем вехикулуму као што је кукурузно уље. Чврсте супстанце се, ако је могуће, растварају, јер велике дозе чврстих супстанци у гел капсулама не могу ефикасно да се апсорбују. За вехикулуме различите од воде морају да буду познате токсичне карактеристике, а уколико нису познате, исте се одређују пре испитивања.

1.4.2. Услови испитивања

1.4.2.1. Експериментална животиње

Препоручује се млада одрасла домаћа кокошка (Gallus gallus domestícus), стара 8 до 12 месеци. Користе се врсте и сојеви стандардне величине. Кокошке се гаје у условима који им омогућавају слободно кретање.

1.4.2.2. Број и пол

Користе се најмање три третиране групе и контролна група у вехикулума. Са контролном групом вехикулума поступа се исто као и са третираном групом, осим што се изоставља примена испитиване супстанце.

Користи се довољан број кокошки у свакој групи како би се омогућило лишавање живота на хуман начин најмање шест птица за биохемијска одређивања (по три у свакој од две временске тачке) и да шест птица може да преживи 14-дневни период праћења после третмана за патолошка испитивања.

1.4.2.3. Дозни нивои

Дозни нивои се бирају узимајући у обзир резултате акутног испитивања одложене неуротоксичности и постојеће податке о токсичности или кинетици који су доступни за испитивану супстанцу. Највиши дозни ниво одређује се са циљем изазивања

токсичних ефеката, најбоље одложене неуротоксичности, али не смрти нити очигледне патње. Затим се бира опадајући низ нивоа доза како би се показао било који одговор повезан са дозирањем и непостојање штетних ефеката при најнижем дозном нивоу.

1.4.2.4. Испитивање граничне дозе

Уколико испитивање при дозном нивоу од најмање 1.000 mg/kg ТМ/дан, коришћењем поступака описаних у овој студији, не покаже никакве токсичне ефекте и уколико се токсичност не очекује на основу података о структурно сличним супстанцама, није неопходна студија која користи веће дозе. Испитивање граничне дозе се не примењује када излагање људи указује на потребу за коришћењем вишег нивоа дозе.

1.4.2.5. Период посматрања

Све животиње се посматрају најмање једном дневно током периода излагања и 14 дана после тога, све до планираног лишавања живота на хуман начин.

1.4.3. Поступак

Животиње се дозирају испитиваном супстанцом седам дана у недељи кроз период од 28 дана.

1.4.3.1. Општа посматрања

Посматрања се започињу одмах по излагању. Све кокошке се пажљиво прегледају најмање једном дневно у периоду од 28 дана третмана и 14 дана после дозирања или до планираног лишавања живота на хуман начин. Бележе се сви знакови токсичности, укључујући време настанка, врсту, озбиљност и трајање. Посматрања укључују, али нису ограничена на, абнормалности у понашању. Атаксија се мери ординалном скалом за оцењивање која се састоји од најмање четири нивоа. Региструје се парализу. Најмање два пута недељно кокошке одабране за патолошка испитивања се ваде из кавеза и излажу присилној моторичкој активности одређени период, као што је пењање по мердевинама, како би се запазили минимални токсични ефекти. Животиње на самрти и животиње које трпе озбиљан стрес или бол уклањају се када се примете ове појаве, лишавају се живота на хуман начин и постмортално прегледају.

1.4.3.2. Телесна маса

Свим кокошкама се мери телесна маса пре примене испитиване супстанце и најмање једном недељно после тога.

1.4.3.3. Биохемијска испитивања

Шест случајно одабраних кокошака из сваке третиране и контролне групе вехикулума лишавају се живота на хуман начин неколико дана након последње дозе. Припрема се и испитује мозак и лумбална кичмена мождина на инхибицију активности циљне естеразе неуропатије. Може бити корисно припремити и испитати ткиво ишијадичног нерва на инхибицију активности циљне естеразе неуропатије. Три птице из контролне и сваке третиране групе лишавају се живота на хуман начин после 24 сата и три птице 48 сати после задњег дозирања. Уколико подаци из акутне студије или других студија (нпр. токсикокинетике) указују да су друге временске тачке после задњег дозирања погодније, примењују се те тачке, а образложење се документује.

Анализа ацетилхолинестеразе (у даљем тексту: AChE) може се обавити на тим узорцима, ако се то сматра одговарајућим. Може се догодити *in vivo* спонтана реактивација AChE и довести до подцењивања потентности супстанце као AChE инхибитора.

1.4.3.4. Постмортални преглед

Постмортални преглед свих животиња (планирано лишених живота на хуман начин или лишених живота на самрти) укључује посматрање изгледа мозга и кичмене мождине.

1.4.3.5. Хистопатолошка испитивања

Нервно ткиво животиња које преживе период посматрања и које се не користи за биохемијска испитивања подвргава се микроскопском прегледу. Ткива се фиксирају in situ, коришћењем техника перфузије. Пресеци укључују мали мозак (средњи лонгитудинални ниво), продужену мождину, кичмену мождину и периферне живце. Пресеци кичмене мождине се узимају из горњег цервикалног сегмента, средње торакалоне и лумбо-сакралне регије. Узимају се пресеци дисталне регије тибијалног живца и његових грана до гастрокнемијусног мишића и скијатичног живца. Пресеци се боје одговарајућим мијелин и аксон-специфичним бојама. Изводи се микроскопски преглед на очуваним ткивима свих животиња у контролној и третираној групи којој је давана висока доза. Када постоје докази за ефекте код групе високе дозе, обавља се микроскопски преглед код кокошки из група средње и ниже дозе.

2. ПОДАЦИ

Негативни резултати ефеката изабраних за посматрање у овој методи (биохемијска, хистопатолошка испитивања и посматрање понашања) обично не захтевају даље испитивање одложене неуротоксичности. Двосмислени или неуверљиви резултати за ове ефекте могу захтевати даље оцењивање.

Подаци се наводе појединачно и то табеларно. За сваку експерименталну групу наводи се: број животиња на почетку испитивања, број животиња које показују оштећења, бихевиоралне или биохемијске ефекте, типови и озбиљност тих оштећења или ефеката и проценат животиња које показују сваки тип и озбиљност оштећења или ефекта.

Налази ове студије оцењују се у смислу инциденце, озбиљности и корелације бихевиоралних, биохемијских и

хистопатолошких ефеката и других опажених ефеката у третираним и контролним групама.

Нумерички резултати оцењују се одговарајућим и прихваћеним статистичким методама. Статистичке методе се бирају приликом осмишљавања студије.

3. ИЗВЕШТАЈ

Извештај о испитивању, уколико је могуће, садржи податке о:

1) Експерименталним животињама:

– коришћени сој;

– број и старост животиња;

– извор, услови смештаја, итд.;

– индивидуалне телесне масе животиња на почетку испитивања.

2) Условима испитивања:

– детаљи о препарату испитиване супстанце, стабилност и хомогеност, кад одговара;

– оправдање избора вехикулума;

– детаљи о примени испитиване супстанце;

– детаљи о квалитету хране и воде;

– образложење избора дозе;

– спецификација примењених доза укључујући детаље о вехикулуму, запремини и физичком облику примењеног материјала;

– оправдање избора других временских тачака за биохемијска одређивања, уколико време није 24 сата и 48 сати.

3) Резултатима:

– подаци о телесној маси;

– подаци о токсичном одговору по групи, укључујући морталитет;

– доза без штетног дејства;

– природа, озбиљност и трајање клиничких запажања (било да су реверзибилни или не);

– детаљан опис биохемијских метода и налаза;

– налази обдукције;

– детаљан опис свих хистопатолошких налаза;

– статистичка обрада резултата, кад одговара.

4) Образложењу резултата.

5) Закључцима.

B.39. ИСПИТИВАЊЕ ВАНРЕДНЕ СИНТЕЗЕ ДНК (UDS) НА ЋЕЛИЈАМА ЈЕТРЕ СИСАРА *IN VIVO*

1. МЕТОДЕ ИСПИТИВАЊА

Ова метода заснива се на Упутству за испитивање OECD 486, Unscheduled DNK Synthesis (UDS) Test with Mammalian Liver Cells *In vivo* (1997).

1.1. УВОД

Сврха испитивања ванредне синтезе ДНК (у даљем тексту: UDS) на ћелијама јетре сисара *in vivo* је идентификација испитиваних супстанци које узрокују поправку ДНК у ћелијама јетре третираних животиња [1,2,3,4].

Ово *in vivo* испитивање даје методу за истраживање генотоксичних ефеката хемикалија у јетри. Крајњи ефекат који се мери је индикативан за оштећење ДНК и каснију поправку у ћелијама јетре. Јетра је обично главно место метаболизма апсорбованих супстанци, па је то одговарајуће место за мерење оштећења ДНК *in vivo*.

Није прикладно користити ово испитивање уколико постоје докази да испитивана супстанца неће доспети у циљно ткиво.

Крајњи ефекат UDS мери се одређивањем преузимања означених нуклеозида у ћелије које не пролазе кроз редовну (у s-фази) ДНК синтезу. Техника која се највише користи је одређивање преузимања тимидина означеног трицијумом (у даљем

тексту: ^{3}H-TdR) ауторадиографијом. Јетре пацова се највише користе за *in vivo* UDS испитивања. Могу се користити и друга ткива осим јетре, али нису предмет ове методе.

Детекција UDS ефекта зависи од броја ДНК база које су уклоњене и замењене на месту оштећења. UDS испитивање је посебно користан за детектовање „дугачке поправке" (20 до 30 база) изазваног супстанцом. Обрнуто „кратка поправка" (1 до 3 базе) детектује се с много мањом осетљивошћу. Мутагени догађаји могу настати због непоправљених, погрешно поправљених или погрешно репликованих оштећења ДНК. Обим UDS реакције не даје индикације поузданости процеса опоравка. Могуће је да мутаген реагује са ДНК, али да се оштећење ДНК не поправи кроз процес поправке изрезивањем. Недостатак специфичних података о мутагеној активности које даје UDS испитивање компензује се потенцијалном осетљивошћу овог крајњег ефекта од интереса, будући да се прати целокупни геном.

Видети Општи увод.

1.2. ДЕФИНИЦИЈЕ

Ћелије у поправци јесу виша нето нуклеарна зрнца од подешене вредности која се оправдава у лабораторији која врши испитивање.

Нето нуклеарна зрнца (net nuclear grains, у даљем тексту: NNG) јесте квантитативна мера за UDS активност ћелија у ауторадиографским UDS испитивањима, обрачуната одузимањем просечног броја цитоплазматских зрнаца у деловима цитоплазме еквивалентним нуклеусу (у даљем тексту: CG) од броја нуклеарних зрнаца (у даљем тексту: NG), односно: NNG = NG — CG. NNG број се добија за појединачне ћелије, а затим се збраја за ћелије у култури, у паралелним културама, итд.

Ванредна синтеза ДНК (у даљем тексту: UDS) јесте синтеза ради поправке ДНК после уклањања и одстрањивања низа ДНК који садржи подручје оштећења које је узроковано хемијском супстанцом или физичким агенсом.

1.3. ПРИНЦИП МЕТОДЕ

UDS испитивање на ћелијама јетре сисара *in vivo* указује на синтезу ради поправке ДНК после уклањања и одстрањивања низа ДНК који садржи подручје оштећења које је узроковано хемијском супстанцом или физичким агенсом. Испитивање се обично заснива на уграђивању ^{3}H-TdR у ДНК ћелија јетре које имају ниску фреквенцију ћелија у S-фази ћелијског циклуса. Преузимање ^{3}H-TdR одређује се ауторадиоографијом, будући да ова техника није осетљива на интерференције из ћелија у S-фази као што је то нпр. употреба течног сцинтилацијског бројања.

1.4. ОПИС МЕТОДЕ

1.4.1. Припреме

1.4.1.1. Избор животињске врсте

Обично се користе пацови, мада може да се користи било која врста сисара. Уобичајено се користе сојеви младих здравих одраслих животиња. На почетку студије варијација у телесној маси животиња треба да буде минимална и да не прелази ± 20% средње телесне масе за сваки пол.

1.4.1.2. Услови смештаја и исхране

Примењују се општи услови наведени у Општем уводу, мада влажност ваздуха треба да буде између 50% и 60%.

1.4.1.3. Припрема животиња

Здраве младе одрасле животиње распоређују се случајним избором у контролну и третиране групе. Кавези се распоређују тако да се минимализују могући ефекти положаја кавеза. Животиње се идентификују појединачно и држе у кавезима најмање пет дана пре почетка студије како би се омогућила аклиматизација на лабораторијске услове.

1.4.1.4. Испитивана супстанца/Препарат

Пре дозирања животиња чврсте испитиване супстанце се растварају или суспендују у одговарајућим растварачима или вехикулумима и, уколико је потребно, разблажују. Течне испитиване супстанце могу да се дозирају директно или разблажене пре дозирања. Примењују се свежи препарати испитиване супстанце осим уколико подаци о стабилности не указују на прихватљивост чувања.

1.4.2. Услови испитивања

1.4.2.1. Растварач/вехикулум

Растварач/вехикулум не сме да узрокује токсичне ефекте при коришћеним дозним нивоима и не сме да се сумња на хемијске реакције са испитиваном супстанцом. Уколико се користе растварачи/вехикулуми који нису добро познати, њихово укључивање треба подупрети подацима о њиховој компатибилности. Препоручује се да се, кад год је могуће, прво размотри примена воденог растварача/вехикулума.

1.4.2.2. Контроле

Истовремене позитивне и негативне контроле (растварач/вехикулум) се укључују у сваки део експеримента који се независно изводи. Осим третмана испитиваном супстанцом, са животињама у контролној групи се поступа исто као и са животињама у третираним групама.

Позитивне контроле су супстанце за које је познато да производе UDS када се примене при нивома изложености за које

се очекује да дају уочљиво повећање у односу на позадину. Позитивне контроле које захтевају метаболичку активацију се користе у дозама које изазивају умерени ефекат[4]. Дозе се могу одабрати тако да су ефекти јасни али не откривају тренутно идентитет кодираних слајдова ономе који чита. Примери супстанци које се могу користити као позитивне контроле:

Табела 1.

Време узорковања	Супстанца	CAS бр.	EINECS бр
Рано узорковање (2 до 4 сата)	*N*-нитрозодиметиламин	62-75-9	200-249-8
Касно узорковања (12 до 16 сати)	*N*-2-флуоренилацетамид (2-AAF)	53-96-3	200-188-6

Могу се користити и друге одговарајуће супстанце као позитивне контролне. Прихватљиво је да се позитивна контрола примени другачијим путем од испитиване супстанце.

1.5. ПОСТУПАК

1.5.1. Број и пол животиња

Користи се одговарајући број животиња како би се узеле у обзир природне биолошке варијације у ефекту испитивања. Број животиња је најмање три животиње по групи које се могу анализирати. Тамо где је акумулирана значајна историјска база података потребне су само једна или две животиње за истовремене негативне и позитивне контролне групе.

Уколико у време студије постоје расположиви подаци из студија за исте врсте и коришћење истог пута излагања које показују да не постоје битне разлике у токсичности међу половима, довољно је испитивање на само једном полу, превасходно на мужјацима. Ако је људско излагање хемикалијама специфично за пол, као што је то нпр. с неким фармацеутским агенсима, испитивање се обавља на животињама одговарајућег пола.

1.5.2. Распоред третмана

Испитиване супстанце се обично примењују као један третман.

1.5.3. Дозни нивои

Уобичајено се користе најмање два дозна нивоа. Највиша доза се дефинише као доза која узрокује знакове токсичности који су такви да би се за више нивое доза, засноване на истом режиму дозирања, очекивало да узрокују смртност. Нижа доза треба да буде 50% до 25% више дозе.

Супстанце са специфичним биолошким активностима при ниским нетоксичним дозама (као што су хормони и митогени) могу да буду изузеци од критеријума за одређивање доза и оцењују се од случаја до случаја. Уколико се обавља студија налажења распона, јер нису расположиви одговарајући подаци, изводи се у истој лабораторији уз коришћење исте врсте, соја, пола и режима третирања као и у главној студији.

Највиша доза се може дефинисати и као доза која производи одређене индикације токсичности у јетри (нпр. пикнотички нуклеуси).

1.5.4. Испитивање граничне дозе

Уколико испитивање коришћењем дозе од најмање 2.000 mg/kg ТМ примењене у једном третману или у два третмана истог дана не покаже токсичне ефекте и уколико генотоксичност није очекивана на основу података из структурно сличних супстанци, није неопходна потпуна студија. Очекивано излагање људи може да укаже на потребу за коришћењем вишег нивоа дозе у испитивању граничне дозе.

1.5.5. Примена доза

Испитивана супстанца се примењује помоћу гастричне цеви или прикладним инструментом за интубацију. Други путеви излагања могу бити прихватљиви ако се могу оправдати. Не препоручује се интраперитонеални начин, будући да јетра може да се изложи испитиваној супстанци директно, а не преко циркулационог система. Максимална запремина течности која може присилно да се примени или убризга одједном зависи од величине експерименталне животиње. Ова запремина не сме да прелази 2 ml/100g ТМ. Коришћење већих запремина мора бити оправдано. Осим код иритабилних или корозивних супстанци које уобичајено показују лошије ефекте при вишим концентрацијама, варијабилност у испитиваној запремини се минимализује прилагођавањем концентрације како би се обезбедила стална запремина при свим нивоима доза.

1.5.6. Припрема ћелија јетре

Ћелије јетре припремају се од третираних животиња обично 12 до 16 сати после дозирања. Углавном је неопходно додатно раније време узорковања (обично 2 до 4 сата после третмана), осим уколико постоји јасан позитивни ефекат унутар 12 до 16 сати. Алтернативно време узорковања може се користити кад је то оправдано на основу токсикокинтичких података.

Краткотрајне културе ћелија јетре сисара обично се добијају перфузијом јетре in situ колагеназом и омогућавањем свеже одвојеним ћелијама јетре да се причврсте на прикладну подлогу. Ћелије јетре животиња негативне контроле имају вијабилитет[5] од најмање 50%.

1.5.7. Одређивање UDS

Свеже изоловане ћелије јетре сисара инкубирају се са медијумом који садржи ^{3}H-TdR током одговарајућег временског периода, нпр. 3 до 8 сати. На крају периода инкубације медијум се уклања од ћелија које се тада могу инкубирати са медијмом који садржи вишак неозначеног тимидина како би се избегла неуграђена радиооактивност („хладна потрага”). Ћелије се затим испирају, фиксирају и суше. Хладна потрага није неопходна за продужена времена инкубације. Слајдови се потапају у ауторадиографску емулзију, излажу у мраку (нпр. у фрижидеру 7 до 14 дана), развијају, боје и изложена сребрна зрнца се пребројавају. Од сваке животиње припрема се два до три слајда.

1.5.8. Анализа

Препарати слајдова садрже довољно ћелија нормалне морфологије како би се омогућило значајно оцењивање UDS. Препарати се микроскопски испитују на знаке очигледне цитотоксичности (нпр. пикноза, смањен ниво радио означавања).

Сјалдови се кодирају пре пребројавања зрнаца. Обично се добије 100 ћелија од сваке животиње у најмање два слајда. Мање од 100 ћелија по животињи, се образлаже. Не пребројавају за нуклеуси S-фазе, већ се бележи размера S-фазе.

Количина уграђених ^{3}H-TdR у једру и цитоплазми морфолошки нормалних ћелија, доказана таложењем(deposition) сребрних зрнаца, утврђује се одговарајућим методама.

Број зрнаца се одређује по једру (нуклеарна зрнца, у даљем тексту: NG) и једру – еквивалентним подручјима по цитоплазми (цитоплазматска зрнца, у даљем тексту: CG). Број CG се мери узимањем највише означеног подручја цитоплазме или узимањем просека два или три броја цитоплазматских зрнаца у поређењу са једром. Друге методе пребројавања (нпр. бројавање целих ћелија) могу се користити ако је то оправдано[6].

2. ПОДАЦИ

2.1. ОБРАДА РЕЗУЛТАТА

Наводе се подаци о појединачним слајдовима и животињама. Сви подаци се наводе табеларно. Нето нуклеарна зрнца (у даљем тексту: NNG) се израчунавају за сваку ћелију, за сваку животињу и сваку дозу и време, и то одузимањем броја CG од броја NG. Уколико се броје „ћелије у опоравку”, критеријуми за дефинисање „ћелија у опоравку” се образлажу и заснивају на подацима негативне контроле раније или конкурентне студије. Нумерички резултати могу бити оцењени статистичким методама. Уколико се користе статистичке методе, бирају се и оправдавају пре извођења студије.

2.2. ПРОЦЕНА И ТУМАЧЕЊЕ РЕЗУЛТАТА

Критеријуми за позитивне одговоре укључују:

а) NNG вредности изнад претходно задатог прага, а што је оправдано на основу лабораторијских историјских података или

б) NNG вредности које су значајно веће него истовремена контрола.

Критеријуми за негативне одговоре укључују:

а) NNG вредности у оквиру/испод историјског прага контроле или

б) NNG вредности које нису значајно веће од истовремене контроле.

Потребно је размотрити биолошку релевантност података, односно параметре као што су међуживотињска варијација, однос доза-одговор, а узима се у обзир и цитотоксичност. При оцењивању резултата испитивања могу се користити статистичке методе. Статистички значај не треба да буде једини одређујући фактор за позитивни одговор.

Већина експеримената даје јасно позитивне или негативне резултате, у ретким случајевима подаци онемогућују дефинитивну оцену о активности испитиване супстанце. Резултати могу остати двосмислени или сумњиви без обзира на број понављања експеримента.

Позитивни резултат UDS испитивања на ћелијама јетре сисара *in vivo* указује да испитивана супстанца узрокује оштећење ДНК у ћелијама јетре сисара *in vivo* које се може поправити ванредном синтезом ДНК *in vitro*. Негативни резултат указује да, под условима испитивања, испитивана супстанца не узрокује оштећења ДНК која су уочљива овим испитивањем.

Треба продискутовати вероватноћу да испитивана супстанца доспе у системску циркулацију или специфично у циљано ткиво (нпр. системска токсичност).

3. ИЗВЕШТАЈ

Извештај о испитивању, уколико је могуће, садржи податке о:

1) Растварачу/вехикулуму:

– оправдање за избор вехикулума;

– растворљивост и стабилност испитиване супстанце у растварачу/вехикулуму, уколико је познато.

2) Експерименталним животињама:

– коришћена врста/сој;

– број, старост и пол животиња;

– извор, услови смештаја, исхрана, итд.;

– индивидуална телесна маса животиња на почетку испитивања, укључујући распон телесне масе, средњу вредност и стандардну девијацију за сваку групу.

3) Условима испитивања:

– позитивне и негативне контроле вехикулума/растварача;

– подаци из студије тражења распона, уколико је обављена;

– образложење избора нивоа доза;

– детаљи о препарату испитиване супстанце;

– детаљи о примени испитиване супстанце;

– образложење пута примене;

– методе провере да је испитивани агенс доспео до системске циркулације или циљног ткива, уколико је примењиво;

– конверзија из концентрације испитиване супстанце у храни/води за пиће (ppm) до стварне дозе (mg/kg телесна маса/дан), уколико је примењиво;

– детаљи о квалитету хране и воде;

– детаљан опис третмана и узорковања;

– методе мерења токсичности;

– методе припреме ћелија јетре и култура;

– коришћена ауторадиографска техника;

– број припремљених слајдова и број пребројаних ћелија;

– критеријуми оцењивања;

– критеријуми да је испитивање позитивно, негативно или двосмислено.

4) Резултатима:

– индивидуални слајд, средње вредности по животињи и групи за нуклеарна зрнца, цитоплазматска зрнца, инето нуклеарна зрнца;

– однос доза-ефекат, уколико је доступан;

– статистичка оцена, уколико постоји;

– знаци токсичности;

– подаци о истовременој негативној (растварач/вехикулум) и позитивној контроли;

– историјски подаци о негативној (растварач/вехикулум) и позитивној контроли с распоном, средњом вредношћу и стандардним девијацијама;

– број „ћелија у поправци” ако је утврђен;

– број ћелија S-фазе ако је утврђен;

– вијабилитет ћелија.

5) Образложењу резултата.

6) Закључцима.

4. ЛИТЕРАТУРА

1. Ashby, J., Lefevre, P.A., Burlinson, B. and Penman, M.G. (1985). An Assessment of the *In vivo* Rat Hepatocyte DNK Repair Assay. Mutation Res., 156, 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, 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, pp. 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, 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* DNK Repair Assay (UDS). Mutation Res., 291, 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 DNK Repair Assay. Environ. Mutagen, 4, 553-562.

B.40. *IN VITRO* ИСПИТИВАЊЕ КОРОЗИВНОГ ОШТЕЋЕЊА КОЖЕ: ИСПИТИВАЊЕ ТРАНСКУТАНОГ ЕЛЕКТРИЧНОГ ОТПОРА (TER)

1. МЕТОДА ИСПИТИВАЊА

Ова метода заснива се на Упутству за испитивање OECD 430 (2004).

1.1. УВОД

Корозивно оштећење коже односи се на стварање иреверзибилног оштећења ткива у кожи по наношењу материјала који се испитује (као што је дефинисано у ГХС)[1]. Ова метода обезбеђује процедуру којом се процена корозивности не изводи на живим животињама.

Процена корозивности за кожу укључује употребу лабораторијских животиња[2]. Забринутост због бола и патње животиња које су укључене у овај поступак наводи се у ревизији методе B.4. која је дата у овом прилогу, а која дозвољава одређивање корозивног оштећења коже употребом алтернативних, *in vitro* метода, да би се избегли бол и патња животиња.

Први корак ка дефинисању алтернативних испитивања који се могу користити за испитивање корозивности за кожу у регулаторне сврхе било је извођење превалидационих студија[3]. Потом је изведена[6, 7, 8] формална валидација студија *in vitro* метода за процену корозивног оштећења коже[4, 5]. Исход ових студија и друга објављена литература довели су до препоруке да се следећа испитивања могу користити за процену *in vivo* корозивности за кожу[9, 10, 11]: испитивање са моделом хумане коже (видети методу B.40 *bis* која је дата у овом прилогу) и испитивање транскутаног електричног отпора (ова метода).

Студија валидације и друге објављене студије потврђују да је испитивање транскутаног електричног отпора (TER) коже пацова[12, 13] могуће поуздано направити разлику између познатих корозива за кожу и некорозива[5, 9].

Испитивање које се описује у овој методи омогућава идентификацију корозивних хемијских супстанци и смеша. То даље омогућава идентификацију супстанци и смеша које нису корозивне када је то поктрепљено одређивањем тежине доказа коришћењем (на основу) постојећих информација (нпр. pH, однос структура – активност, хумани или животињски подаци)[1, 2, 11, 14]. То не даје податак о иритацији коже, нити дозвољава субкласификацију корозивне супстанце као што је то дозвољено у ГХС[1].

За потпуну процену локалних ефеката на кожи после једнократног излагања путем коже, препоручује се да се прати следећа стратегија испитивања као што је додато у испитивању методи B.4.[2] која је дата у овом прилогу и као што је дато у ГХС[1]. Ова стратегија испитивања укључује извођење *in vitro* испитивање за корозивно оштећење коже (као што је описано у овој методи) и иритације коже пре разматрања испитивања на живим животињама.

1.2. ДЕФИНИЦИЈЕ

Корозивно оштећење *in vivo* јесте настанак иреверзибилних оштећења коже односно видљиве некрозе у епидермису и дермису након четворочасовне примене испитиване супстанце. Корозивно оштећење коже карактерише се према типу изазваног оштећења као:улкус, крварење или крваве красте и на крају периода посматрања од 14 дана према промени боје коже условљене перутањем и појави површина са алопецијом и ожиљног ткива. У циљу процене нејасних оштећења обављају се хистопатолошка испитивања.

Транскутани електрични отпор (у даљем тексту: TER) јесте мера електричне импеданце коже, као вредност отпора у кило омима. Једноставна и снажна метода процене функције баријере снимањем проласка јона кроз кожу помоћу апаратуре Wheatstone bridge.

1.3. РЕФЕРЕНТНЕ СУПСТАНЦЕ

Табела 1. Референтне хемикалије

Назив	EINECS број	CAS број	
1,2-диаминопропан	201-155-9	78-90-0	јако корозивно
акрилна киселина	201-177-9	79-10-7	јако корозивно
2-терц- бутилфенол	201-807-2	88-18-6	корозивно
Калијум-хидроксид (10%)	215-181-3	1310-58-3	корозивно

сумпорна киселина (10%)	231-639-5	7664-93-9	корозивно
октанска киселина (каприлна киселина)	204-677-5	124-07-02	корозивно
4-амино-1,2,4-триазол	209-533-5	584-13-4	није корозивно
еугенол	202-589-1	97-53-0	није корозивно
Фенетил-бромид	203-130-8	103-63-9	није корозивно
тетрахлоретилен	204-825-9	27-18-4	није корозивно
изостеаринска киселина	250-178-0	30399-84-9	није корозивно
4-(метилтио)-бензалдехид	222-365-7	3446-89-7	није корозивно

Већина наведених хемикалија преузета је са списка хемикалија изабраних за међународну студију валидације ECVAM[4]. Њихов избор се базира на следећим критеријумима:

а) једнак број корозивних и некорозивних супстанци;

б) комерцијално доступне супстанце које покривају већину релевантних хемијских класа;

в) обухватање јако корозивних као и мање корозивних супстанци како би се омогућило разликовање на основу корозивног потенцијала;

г) избор хемикалија којима се може руковати у лабораторији без постављања других озбиљних опасности осим корозивности.

1.4. ПРИНЦИП МЕТОДЕ

Хемикалија која се испитује примењује се до 24 сата на епидермалне површине дискова коже у систему за испитивање који се састоји од две коморе у коме дискови коже функционишу као преграда између комора. Дискови коже су узети од хумано усмрћених пацова старости 28 до 30 дана. Корозивни материјали се идентификују према њиховом својству да продукују губитак интегритета и заштитне функције stratum corneum-а, што се мери као смањење TER испод граничног нивоа[12]. За TER пацова, гранична вредност од 5 kΩ изабрана је на основу опсежних података за широк опсег хемикалија где је велика већина вредности била или јасно доста изнад (често > 10 кΩ или доста испод (често < 3 kΩ) ове вредности[12]. Материјали који нису корозивни код животиња али јесу или нису иритабилни не снижавају TER испод ове граничне вредности. Коришћење других препарата коже или друге опреме може да измени граничну вредност и захтева даљу валидацију. Корак везивања боје укључен је у поступак испитивања за потврду позитивних резултата TER укључујући вредности приближне 5кΩ.

Корак везивања боје одређује да ли је повећање у пропустљивости јона последица физичког оштећења stratum corneum-а. Метода испитивања TER која користи кожу пацова указује на *in vivo* корозивност на кунићима која се процењује у методи испитивања B.4. која је дата у овом прилогу[2]. *In vivo* испитивање на кунићима је високо конзервативан у погледу на корозивност и иритабилност за кожу у поређењу са „patch” тестом на хуманој кожи[15].

1.5. ОПИС МЕТОДЕ

1.5.1. Животиње

Користе се пацови јер је осетљивост њихове коже на хемикалије у овој методи претходно приказана[10]. Старост (у тренутку узимања коже) и сој пацова су веома важни како би се обезбедило да су фоликули длаке у фази мировања пре него што почне раст крзна одраслих.

Длака на леђима и боку младих, приближно 22 дана старих мужјака или женки пацова (изведених од Wistar или сличног соја) пажљиво се уклони помоћу малих маказа. Онда се животиње перу пажљивим брисањем, док се ограничени део потапа у раствор антибиотика (који садржи, нпр. стрептомицин, пеницилин, хлорамфеникол и амфотерицин, у концентрацијама које имају ефекат инхибиције раста бактерија). Животиње се перу антибиотицима поново трећег и четвртог дана после првог прања и користе се током три дана после другог прања, када се stratum corneum опоравио од одстрањивања длаке.

1.5.2. Припрема дискова коже

Животиње се хумано лишавају живота када су 28 до 30 дана стари. Ово доба је критично. Дорзално-латерална кожа сваке животиње уклони се и скине се прекомерна субкутана масноћа пажљивим гуљењем са коже. Дискови коже пречника од око 20 mm се уклоне. Кожа се може чувати пре него што се дискови употребе када је показано да су подаци позитивне и негативне контроле једнаки онима који се добију са свежом кожом.

Сваки диск коже се поставља преко једног од крајева политетрафлуороетиленске (у даљем тексту: ПТФЕ) цеви, обезбеђујући да је епидермална површина у контакту са цеви. Гумени „О” прстен ставља се на крај цеви како би држао кожу на месту и вишак ткива се одстрањује. Димензије цеви и „О” прстена приказане су на Слици 2. Гумени „О” прстен се тада пажљиво печати за крај ПТФЕ цеви вазелином. Цев се подупире опружном подлошком унутар рецепторске коморе која садржи раствор магнезијум сулфата (154 mM) (Слика 1). Диск коже је потпуно урођен у раствор $MgSO_4$. Чак 10 до 15 дискова коже може се добити од једне коже пацова.

Пре него што почне испитивање, мери се електрични отпор два диска коже као поступак контроле квалитета за сваку кожу животиње. Оба диска дају вредност отпора већу од 10 kΩ како би се преостали дискови користили у испитивању. Уколико је вредност отпора мања од 10 kΩ, преостали дискови те коже се одбацују.

1.5.3. Примена испитиваних и контролних сусптанци

Течне испитиване супстанце (150 µL) равномерно се наносе на епидермалну површину унутар цеви. Приликом испитивања чврстих материјала, наноси се довољна количина чврсте материје уједначено на диск тако да читава површина епидермиса буде покривена. Преко чврсте материје додаје се дејонизована вода (150 µL) и цев се благо продрма. Како би се постигао максималан контакт с кожом, чврсте материје је можда потребно загрејати до температуре од 30° C да би се отопиле или је потребно омекшати испитивану супстанцу или је уситнити да се направи зрнасти материјал или прах.

Три диска коже користе се за сваку испитивану и контролну супстанцу. Испитиване супстанце се примењују 24 сата при температури од 20° C до 23° C. Испитивана супстанца се уклања прањем под млазом воде температуре до 30° C све док се више супстанце не може одстранити.

1.5.4. TER мерења

Импеданца коже се мери тако што се мери TER нисковолтажним уређајем с наизменичном струјом Wheatstone databridge[13]. Опште карактеристике моста су радни напон 1-3 Volt-а, наизменична струја од 50 Hz до 1.000 Hz синусног или четвртастог облика и опсег мерења од најмање 0,1 kΩ до 30 kΩ. „Databridge" који је коришћен у студији валидације где је мерио индуктивност, капацитивност и отпор до вредности од редом 2.000 H, 2.000 µF и 2 MΩ, при фреквенцијама од 100 Hz или 1 kHz користећи редне или паралелне вредности. У сврху TER корозивности, мерења у испитивању се снимају у отпору, при фреквенци од 100 Hz и коришћењем редних вредности. Пре мерења електричног отпора површински напон коже се смањује додавањем довољне запремине 70% етанола да покрије епидерм. После неколико секунди етанол се уклања из цеви и ткиво се тада хидрира додавањем раствора 3 mL раствора магнезијум сулфата (154 mM). „Databridge" електроде се постављају на обе стране дискова коже како би се измерио отпор у kΩ/диск коже (Слика 1). Димензије електрода и дужина електрода која је изложена испод штипаљки приказане су на Слици 2. Штипаљка која је закачена на унутрашњу електроду отворена је на врху ПТФЕ цеви током мерења отпора како би се обезбедило да је дужина електроде која је урођена у раствор MgSO4 стална. Спољна електрода се налази унутар рецепторске коморе тако да належе на дно коморе. Размак између опружне подлошке и дна ПТФЕ цеви одржава се константним (Слика 2), будући да овај размак утиче на добијене вредности отпора. Због тога, размак између унутрашње електроде и диска коже треба да буде константан и минималан (1 mm до 2 mm).

Уколико је измерена вредност отпора већа од 20kΩ, то може бити због тога што остаци испитиване супстанце прекривају епидермалну поврину диска коже. Може се покушати са даљим одстрањивањем овог слоја, нпр. зачепљивањем ПТФЕ цеви палцем у рукавици и протресањем приближно 10 секунди. Раствор магнезијум сулфата се одстрањује и мерење отпора се понавља са свежим магнезијум сулфатом.

Својства и димензије апаратуре за испитивање и поступка испитивања који се користе могу да утичу на добијене вредности TER. Гранична вредност од 5 kΩ је изведена из података добијених са специфичном апаратуром и поступком који су описани у овој методи. Другачија гранична вредност и вредности контроле могу се применити уколико су услови испитивања измењени или се користи другачија апаратура. Због тога је неопходно калибрисати ову методологију и вредности граничног отпора испитивањем серије референтних стандарда који су изабрани од хемикалија коришћених у студији валидације[4, 5] или од хемијских класа сличних хемикалији која се испитује. Група одговарајућих референтних хемикалија дата је у Табели 1.

1.5.5. Методе везивања боје

Експозиција одређеним материјалима који нису корозивни може да има за последицу смањење отпора испод границе од 5 kΩ дозвољавајући пролазак јона кроз stratum corneum тако смањујући електрични отпор[5]. На пример, неутралне органске и хемикалије које имају површински активна својства (укључујући детергенте, емулгаторе и друге сурфактанте) могу да уклоне липиде коже чинећи баријеру више пропустљивом за јоне. Ако су TER вредности испитиване супстанце мање од или приближно 5 kΩ у одсуству видљивог оштећења, процена продирања боје изводи се на контролним и третираним ткивима да би се одредило да ли су добијене TER вредности резултат повећане пропустљивости коже или корозивно оштећење коже[3, 5]. У другом случају када постоји прекид у stratum corneum-у, боја сулфородамин Б, када се нанесе на површину коже брзо продире и боји потпорно ткиво. Ова одређена боја је стабилна према широком опсегу хемикалија и на резултате не утиче процес екстракције који је описан испод.

1.5.5.1. Наношење и уклањање сулфородамин Б боје

После процене TER, магнезијум сулфат се одстрањује из цеви и кожа се пажљиво прегледа како би се уочило оштећење. Уколико нема видљивог већег оштећења, боја сулфородамин Б (Acid Red 52; C.I. 45100; EINECS број 222-529-8; CAS број 3520-42-1), 150 µL 10% (w/v) раствор у дестилованој води наноси се на епидермалну површину сваког диска коже на два сата. Дискови коже се тада испирају са водом са чесме при највише собној температури приближно 10 секунди како би се одстранила сва прекомерна/невезана боја. Сваки диск коже пажљиво се уклони са ПТФЕ цеви и ставља у бочицу (нпр. 20 mL стаклена сцинтилациона бочица) која садржи дејонизовану воду (8 mL). Бочице се лагано мешају пет минута како би се одстранила додатна невезана боја. Овај поступак испирања се затим понавља, после чега се дискови коже уклањају и стављају у бочице које садрже 5mL 30% (w/v) натријум додецилсулфата (SDS) у дестилованој води и инкубирају се преко ноћи на 60° C.

После инкубације сваки диск коже се одстрањује и баца, а преостали раствор се центрифугира осам минута при 21° C (релативна центрифугална сила је око 175× g). Узорак од 1mL супернатанта се разблажује 1 у 5 (v/v) (тј. 1mL + 4mL) са

30% (w/v) SDS у дестилованој води. Оптичка густина (у даљем тексту: OD) раствора мери се на 565 nm.

1.5.5.2. Израчунавање садржаја боје

Садржај боје сулфородамин Б по диску израчунава се из OD вредности[5] (коефицијент моларне естинкције боје сулфородамин Б при 565 nm = 8,7 x 10^4; молекуларна маса = 580). Садржај боје сулфородамин Б одређује се за сваки диск коже коришћењем одговарајуће калибрационе криве и затим се израчунава средња вредност садржаја боје за репликате.

2. ПОДАЦИ

Вредности отпора (kΩ) и средње вредности садржаја боје(µg/диск), када то одговара, за испитивани материјал, као и за позитивне и негативне контроле наводе се табеларно (појединачни подаци испитивања и средње вредности ± S.D.), укључујући податке за поновљене експерименте, средње вредности и појединачне вредности.

2.1. ТУМАЧЕЊЕ РЕЗУЛТАТА

Средње вредности TER прихватају се ако су вредности истовремене позитивне и негативне контроле у прихватљивим оквирима за методу у лабораторији која врши испитивање. Прихватљиви опсези отпора за методологију и апаратуру које су описане дати су у следећој табели:

Табела 1.

контрола	супстанца	опсег отпора (kΩ)
позитивна	10M хлороводонична киселина	0,5 - 1,0
негативна	дестилована вода	10 - 25

Резултати средње вредности садржаја боје прихватају се ако се вредности истовремене контроле налазе у оквиру прихватљивих опсега за методу. Предложени прихватљиви опсези садржаја боје за контролне супстанце за методологију и апаратуру које су описани су:

Табела 2.

контрола	супстанца	опсег садржаја боје (µg/диск)
позитивна	10M хлороводонична киселина	40 – 100
негативна	дестилована вода	15 – 35

Супстанца која се испитује не сматра се корозивном за кожу:

а) ако је средња вредност TER добијена за испитивану супстанцу већа од 5 kΩ или

б) ако је средња вредност TER мања или једнака 5 kΩ и

– диск коже не показује видљиво оштећење и

– средња вредност садржаја боје диска је далеко испод средњег садржаја боје диска истовремене позитивне контроле, 10M HCl.

Испитивана супстанца се сматра корозивном за кожу:

а) ако је средња вредност TER мања или једнака 5 kΩ и диск коже је видљиво оштећен или

б) ако је средња вредност TER мања или једнака 5 kΩ и

– диск коже не показује видљиво оштећење, али

– средња вредност садржаја боје диска је већа или једнака средњој вредности садржаја боје диска истовремене позитивне контроле, 10M HCl.

3. ИЗВЕШТАЈ

Извештај о испитивању садржи податке о:

1) Испитиваним и контролним супстанцама:

– хемијско име као што је IUPAC или CAS име и CAS број, ако је познато;

– чистоћа и састав супстанце или смеше (у тежинским процентима) и физичка природа;

– физичка и хемијска својства као што су физичко стање, pH, стабилност, растворљивост у води, оно што је релевантно за извођење студије;

– третман испитиване/контролне супстанце пре испитивања, ако је примењиво (нпр. загревање, уситњавање);

– стабилност, ако је позната.

2) Експерименталним животињама:

– коришћен сој и пол;

–старост животиња у тренутку када се користе као донорске животиње;

– извор, услови смештаја, исхрана, итд.;

– детаљи припремања коже.

3) Условима испитивања:

– калибрационе криве за апаратуру на којој се врши испитивање;

– калибрационе криве за извођење испитивања везивања боје;

– детаљи поступка испитивања који се користи за мерења TER;

– детаљи поступка испитивања који се користи за процену везивања боје, ако одговара;

– опис сваке измене поступка испитивања;

– опис коришћених критеријума за оцењивање.

4) Резултатима:

– у табели дати подаци испитивања TER и везивања боје (ако је одговарајуће) за сваку појединачну животињу и узорак коже;

– опис сваког примећеног ефекта.

5) Образложењу резултата.

6) Закључцима.

4. ЛИТЕРАТУРА

1. OECD, (2001) Harmonised Integrated Classification System for Human Health and Environmental Hazards of Chemical Substances and Mixtures. OECD Series on Testing and Assessment Number 33. ENV/JM/MONO(2001)6, Paris. http://www.olis.oecd.org/olis/2001doc.nsf/LinkTo/env-jm-mono(2001)6.

2. Testing Method B.4. Acute Toxicity: Dermal Irritation/Corrosion.

3. Botham, P.A., Chamberlain, M., Barratt, M.D., Curren, R.D., Esdaile, D.J., Gardner, J.R., Gordon, V.C., Hildebrand, B., Lewis, R.W., Liebsch, M., Logemann, P., Osborne, R., Ponec, M., Regnier, J.F., Steiling, W., Walker, A.P., and Balls, M., (1995) A prevalidation study on *in vitro* skin corrosivity testing. The report 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. Toxicology. *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. Toxicology. *In vitro* 12, p. 483- 524.

6. OECD, (1996) Final Report of the OECD Workshop on Harmonisation 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, 275-280.

10. ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods)., (2002) ICCVAM evaluation of EpiDermTM, EPISKINTM (EPI-200), and the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) assay: *In vitro* test methods for assessing dermal corrosivity potential of chemicals. NIH Publication No 02-4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA. http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/epiddocs/epis_brd.pdf.

11. OECD (2002) Extended Expert Consultation Meeting on The *In vitro* Skin Corrosion Test Guideline Proposal, Berlin, 1st–2nd November 2001, Secretariat's Final Summary Report, 27th March 2002, OECD ENV/EHS, available upon request from the Secretariat.

12. Oliver, G.J.A., Pemberton, M.A., and Rhodes, C., (1986) An *in vitro* skin corrosivity test –modificationsand validation. Fd. Chem. Toxicol. 24, 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 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 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. Toxicology *In vitro*. 2, p. 7-17.

Слика 1

Апаратура за испитивање коже пацова ТЕР огледом

Слика 2: Димензије политетрафлуороетиленске (ПФТЕ) и рецепторске цеви и електрода које се користе

Критични фактори апаратуре која је приказана:

– унутрашњи промер ПТФЕ цеви;

– дужина електроде у односу на ПТФЕ цев и рецепторску цев, тако да електрода не дотиче диск коже и да је стандардна дужина електроде у контакту са раствором магнезијум сулфата;

– количина раствора магнезијум сулфата у рецепторској цеви даје дубину течности, у односу на ниво у ПТФЕ цев, као што је приказано на Слици 1;

– диск коже је довољно добро причвршћен за ПТФЕ цев, тако да електрични отпор буде права мера својстава коже.

B.40. BIS. *IN VITRO* КОРОЗИВНО ОШТЕЋЕЊЕ КОЖЕ: ИСПИТИВАЊЕ НА МОДЕЛУ ХУМАНЕ КОЖЕ

1. МЕТОДА ИСПИТИВАЊА

Ова метода заснива се на Упутству за испитивање OECD 431 (2004).

1.1. УВОД

Корозивно оштећење коже односи се на стварање иреверзибилног оштећења ткива у кожи по наношењу материјала који се испитује (као што је дефинисано у ГХС)[1]. Ова метода испитивања не захтева употребу живих животиња или животињског ткива за процену корозивности за кожу.

Процена корозивности за кожу укључује употребу лабораторијских животиња[2]. Забринутост због бола и патње животиња које су укључене у овај поступак помиње се у ревизији методе B.4. која је дата у овом прилогу и која дозвољава одређивање корозивног оштећења коже употребом алтернативних, *in vitro* метода, да би се избегли бол и патња животиња.

Први корак ка дефинисању алтернативних испитивања који се могу користити за испитивање корозивности за кожу у регулаторне сврхе било је извођење превалидационих студија[3]. Потом је изведена[6, 7, 8] формална валидација студија *in vitro* метода за процену корозивност оштећења коже[4, 5]. Исход ових студија и друга објављена литература[9] довели су до препоруке да се следећа испитивања могу користити за процену *in vivo* корозивности за кожу[10, 11, 12, 13]: испитивање са моделом хумане коже (ова метода) и испитивање транскутаног електричног отпора (видети методу B.40. која је дата у овом прилогу).

Студије валидације потврђују да је испитивањима а који укључују моделе хумане коже[3, 4, 5, 9] могуће поуздано направити разлику између познатих корозивних и некорозивних супстанци за кожу. Поступак испитивања може да обезбеди назнаку разлике између јаких и мање јаких корозива за кожу.

Испитивање које се описује у овој методи омогућава идентификацију корозивних хемијских супстанци и смеша. То даље омогућава идентификацију супстанци и смеша које нису корозивне када је то поткрепљено одређивањем тежине доказа коришћењем (на основу) постојећих података (нпр. pH, однос структура – активност, хумани и/или животињски подаци)[1, 2, 13, 14]. То обично не даје одговарајуће податке о иритацији коже, нити дозвољава субкласификацију корозивне супстанце као што је то дозвољено у ГХС[1].

За потпуну процену локалних ефеката на кожи после једнократног излагања путем коже, препоручује се да се прати следећа стратегија испитивања као што је дато у методи испитивања B.4. која је дата у овом прилогу[2] и као што је дато у ГХС[1]. Ова стратегија испитивања укључује извођење *in vitro* испитивања за корозивно оштећење коже (као што је описано у овој методи) и иритације коже пре разматрања испитивања на живим животињама.

1.2. ДЕФИНИЦИЈЕ

Корозивно оштећење in vivo јесте настанак иреверзибилних оштећења коже односно видљиве некрозе у епидермису и дермису након четворочасовне примене испитиване супстанце. Корозивно оштећење коже карактерише се према типу изазваног оштећења као:улкус, крварење или крваве красте и на крају периода посматрања од 14 дана према промени боје коже условљене перутањем и појави површина са алопецијом и ожиљног ткива. У циљу процене нејасних оштећења обављају се хистопатолошка испитивања.

Вијабилност ћелија јесте параметар који мери укупну активност ћелијске популације (нпр. способност ћелијске митохондријалне дехидрогеназе да смањи виталну боју МТТ), која, у зависности од циљног показатеља испитивања који се мери и коришћеног дизајна испитивања корелира са укупним бројем и/или виталности ћелија.

1.3. РЕФЕРЕНТНЕ СУПСТАНЦЕ

Табела 1: Референтне хемикалије

Назив	EINECS број	CAS број	
1,2-диаминопропан	201-155-9	78-90-0	јако корозивно
акрилна киселина	201-177-9	79-10-7	јако корозивно
2-терц-бутилфенол	201-807-2	88-18-6	корозивно
калијум-хидроксид (10%)	215-181-3	1310-58-3	корозивно
сумпорна киселина (10%)	231-639-5	7664-93-9	корозивно
октанска киселина (каприлна киселина)	204-677-5	124-07-02	корозивно
4-амино-1,2,4-триазол	209-533-5	584-13-4	није корозивно
еугенол	202-589-1	97-53-0	није корозивно
фенетил-бромид	203-130-8	103-63-9	није корозивно
тетрахлороетилен	204-825-9	27-18-4	није корозивно
изостеаринска киселина	250-178-0	30399-84-9	није корозивно
4-(метилтио)-бензалдехид	222-365-7	3446-89-7	није корозивно

Већина наведених хемикалија преузето је са списка хемикалија изабраних за међународну студију валидације ECVAM[4]. Њихов избор се базира на следећим критеријумима:

а) једнак број корозивних и некорозивних супстанци;

б) комерцијално доступне супстанце које покривају већину релевантних хемијских класа;

в) обухватање јако корозивних као и мање корозивних супстанци како би се омогућило разликовање на основу корозивног потенцијала;

г) избор хемикалија којима се може руковати у лабораторији без постављања других озбиљних опасности осим корозивности.

1.4. ПРИНЦИП МЕТОДЕ

Испитивани материјал наноси се површински на тродимензионални модел људске коже, који се састоји најмање од реконструисаног епидермиса са функционалним stratum corneum-ом. Корозивни материјали се идентификују по њиховој способности да изазову смањење вијабилности ћелија (као што је одређено нпр. коришћењем есеја смањења МТТ[15]) испод дефинисаних граница при одређеним периодима излагања. Принцип испитивања модела хумане коже заснива се на хипотези да корозивне хемикалије могу да продру кроз stratum corneum дифузијом или ерозијом и довољно су цитотоксичне да узрокују одумирање потпорних слојева ћелија.

1.4.1. Поступак

1.4.1.1. Модели људске коже

Модели људске коже могу бити састављени или добијени комерцијално (нпр. модели EpiDerm™ and EPISKIN™)[16, 17, 18, 19] или могу бити развијени или састављени у лабораторији која врши испитивање20, [21]. Употреба хумане коже је предмет домаћих и међународних етичких разматрања и услова. Сваки нови модел се валидира (најмање у обиму који је описан у одељку 1.4.1.1.2. ове методе). Модели хумане коже који се користе за ово испитивање задовољавају следеће:

1.4.1.1.1. Општи услови за модел

Хумани кератиноцити се користе за израду епителијума. Испод функционалног stratum corneum-а присутно је више слојева вијабилних епителијалних ћелија. Модел коже може да има слој са стромалном компонентом. Stratum corneum је вишеслојан са неопходним липидним профилом да ствара функционалну баријеру са снагом да пружи отпор брзом продирању цитотоксичних маркера. Својства састава модела спречавају пролазак материјала око stratum corneum-а до вијабилног ткива. Пролазак испитиваних хемикалија око stratum corneum-а доводи до лошег моделовања експозиције коже. Модел коже је без контаминације бактеријама (укључујући микоплазму) или гљивицама.

1.4.1.1.2. Услови за функционални модел

Величина вијабилности обично се квантификује употребом МТТ или друге виталне боје која се метаболички трансформише. У овим случајевима оптичка густина (у даљем тексту: OD) екстраховане (растворене) боје из негативног контролног ткива је најмање 20 пута већа од OD самог екстракционог растварача (за општи преглед видети литературу[22]). Негативно контролно ткиво је стабилно у култури (обезбеђујући слична мерења вијабилности) у трајању периода испитиваног излагања. Stratum corneum је довољно отпоран да се одупре брзом продирању одређених хемикалија – цитотоксичних маркера (тј. 1% Triton X-100). Ово својство може да буде процењено временом експозиције које је потребно да се смањи вијабилност ћелија за 50% (ET_{50}) (нпр. за моделе EpiDerm™ and EPISKIN™ оно је > 2 сата). Ово ткиво приказује репродуктивност током времена и најбоље између лабораторија. Сем тога, оно треба да може да предвиди корозивни потенцијал референтне хемикалије (видети Табелу 1) када се користи у изабраном протоколу испитивања.

1.4.1.2. Примена испитиваних и контролних супстанци

Два репликата(копије) ткива користе се за сваки третман (време излагања), укључујући контроле. За течне материјале, довољно испитиване супстанце се наноси тако да уједначено прекрије површину коже: користи се најмање 25 µL/cm^2. За чврсте материјале, довољно испитиване супстанце се наноси уједначено да покрије кожу и навлажи се са дејонизованом или дестилованом водом како би се омогућио добар контакт са кожом. Када је прикладно, чврсте супстанце се уситне у прах пре примене. Метода примене треба да буде одговарајућа за испитивану супстанцу (видети литературу[5]). На крају периода излагања, испитивани материјал се пажљиво пере са површине коже са одговарајућом пуфером или 0,9% NaCl.

Истовремене позитивне и негативне контроле се користе за сваку студију како би се обезбедила адекватна перформанса експерименталног модела. Предложене супстанце за позитивну контролу су глацијална сирћетна киселина или 8N KOH. Предложене негативне контроле су 0,9% NaCl или вода.

1.4.1.3. Мерења вијабилности ћелија

Само квантитативне, валидоване методе могу се користити за мерење вијабилности ћелија. Мера вијабилности мора да буде компатибилна са употребом тродимензионалне конструкције ткива. Неспецифично везивање боје не сме да интерферира са мерењем вијабилитета. Боје које се везују за протеин и оне које не подлежу метаболичкој транформацији (нпр. neutral red) зато нису погодне. Најчешће коришћено испитивање је смањење МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2ил)-2,5-дифенилтетразолијум бромид, Тиазол плаво: EINECS број 206-069-5, CAS број 298-93-1)), за који је показано да даје тачне и репродуктивне резултате[5], али могу се користити и друга испитивања. Узорак коже се ставља у раствор МТТ одговарајуће концентрације (нпр. 0,3 – 1mg/mL) на одговарајућој инкубационој температури током три сата. Исталожени плави производ формазан се затим екстрахује употребом растварача (изопропанола) и мери се концентрација формазана се мери одређивањем OD на таласној дужини између 540 nm и 595 nm.

Хемијско дејство испитиваног материјала на виталну боју може да личи на метаболизам ћелије водећи до погрешне процене вијабилности. Ово се дешава када такав испитивани материјал није потпуно уклоњен са коже испирањем[9]. Ако

испитивани материјал директно делује на виталну боју, додатне контроле се користе како би се детектовала и кориговала интерференција испитиване супстанце са мерењем вијабилитета[9, 23].

2. ПОДАЦИ

За свако ткиво наводе се OD вредности и израчунати проценти вијабилности ћелија за сваки испитивани материјал, позитивне и негативне контроле, укључујући податке од репликата поновљених експеримената како одговара, средње и појединачне вредности.

2.1. ТУМАЧЕЊЕ РЕЗУЛТАТА

Добијене OD вредности за сваки испитивани узорак могу се користити за израчунавање процента вијабилитета у односу на негативну контролу, која је 100%. Гранична вредност процента вијабилитета која прави разлику између корозиних и некорозивних материјала (или разлику између различитих класа корзива) или статистичка процедура која се користи да се оцене резултати и идентификују корозивни материјали, јасно се дефинишу, документују и приказују да су одговарајући. Ове граничне вредности утврђују се за време оптимизације испитивања, испитују се током превалидационе фазе и потврђују у валидационој студији. Као пример предвиђање корозивности која је у вези са моделом EpiDermT^{M} је[9]:

Испитивана супстанца се сматра корозивном за кожу:

а) ако је вијабилност после три минута излагања мања од 50% или

б) ако је вијабилност после три минута излагања већа или једнака 50% и вијабилност после једног сата изложености мања од 15%.

Испитивана супстанца се не сматра корозивном за кожу:

а) ако је вијабилност после три минута изложености већа или једнака 50% и вијабилност после 1 сата излагања већа или једнака 15%.

3. ИЗВЕШТАЈ

Извештај о испитивању, уколико је могуће, садржи податке о:

1) Испитиваним и контролним супстанцама:

– хемијско име као што је IUPAC или CAS име и CAS број, ако је познато;

– чистоћа и састав супстанце или смеше (у тежинским процентима);

– физичка и хемијска својства као што су физичко стање, pH, стабилност, растворљивост у води, оно што је релевантно за извођење студије;

– третман испитиване/контролне супстанце пре испитивања, ако је примењиво (нпр. загревање, уситњавање);

– стабилност, ако је позната.

2) Оправдању модела коже и коришћеног поступка.

3) Условима испитивања:

– коришћен систем ћелија;

– податке о калибрацији за уређај за мерење који се користи за мерење вијабилности ћелија (нпр. спектрофотометар);

– сви подаци на које се ослањало за специфични модел коже укључујући његову валидацију;

– детаљи поступка испитивања;

– коришћене дозе;

– опис модификације поступка испитивања;

– референце према историјским подацима за модел;

– опис коришћених критеријума за оцењивање.

4) Резултатима:

– подаци појединачних испитиваних узорака у табели;

– опис других примећених ефеката.

5) Образложењу резултата.

6) Закључцима.

4. ЛИТЕРАТУРА

1. OECD (2001) Harmonised Integrated Classification System for Human Health and Environmental Hazards of Chemical

Substances and Mixtures. OECD Series on Testing and Assessment Number 33. ENV/JM/MONO(2001)6, Paris. http://www.olis.oecd.org/olis/2001doc.nsf/LinkTo/env-jm-mono(2001)6.

2. Testing Method B.4. Acute Toxicity: Dermal Irritation/Corrosion.

3. Botham, P.A., Chamberlain, M., Barratt, M.D., Curren, R.D., Esdaile, D.J., Gardner, J.R., Gordon, V.C., Hildebrand, B., Lewis, R.W., Liebsch, M., Logemann, P., Osborne, R., Ponec, M., Regnier, J.F., Steiling, W., Walker, A.P., and Balls, M., (1995) A prevalidation study on *in vitro* skin corrosivity testing. The report recommendations of ECVAM Workshop 6 ATLA 23, p. 219-255.

4. Barratt, M.D., Brantom, P.G., Fentem, J.H., Gerner, I., Walker, A.P., and Worth, A.P. (1998). The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 1. Selection and distribution of the test chemicals. Toxicology *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. Toxicology *In vitro* 12, p. 483-524.

6. OECD, (1996) Final Report of the OECD Workshop on Harmonisation 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, p. 275-280.

11. ECVAM, (2000) ECVAM News & Views. ATLA 28, p. 365-67.

12. ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods)., (2002) ICCVAM evaluation of EpiDermTM, EPISKINTM (EPI-200), and the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) assay: *In vitro* test methods for assessing dermal corrosivity potential of chemicals. NIH Publication No 02-4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA. http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/epiddocs/epis_brd.pdf.

13. OECD, (2002) Extended Expert Consultation Meeting on The *In vitro* Skin Corrosion Test Guideline Proposal, Berlin, 1st–2nd November 2001, Secretariat's Final Summary Report, 27th March 2002, OECD ENV/EHS, available upon request from the Secretariat

14. Worth, 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 Corrosion. ATLA 26, p. 709-720.

15. Mosmann, T., (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity asssays. J.Immunol. Meth. 65, p. 55-63.

16. Cannon, C.L., Neal, P.J., Southee, J.A., Kubilus, J., and Klausner, M., 1994. New epidermal model for dermal irritancy testing. Toxicology *In vitro* 8, p. 889-891.

17. Ponec, M., Boelsma, E., Weerheim, A., Mulder, A., Boutwstra, J., and Mommaas, M., 2000. Lipid and ultrastructural characterisation of reconstructed skin models. International Journal of Pharmaceutics. 203, p. 211-225.

18. Tinois, E., Gaetani, Q., Gayraud, B., Dupont, D., Rougier, A., Pouradier, D.X., (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. Toxicology *In vitro* 15, p. 57-93.

B.41. *IN VITRO* 3T3 NRU ИСПИТИВАЊЕ ФОТОТОКСИЧНОСТИ

Део први

1. МЕТОДА ИСПИТИВАЊА

Ова метода заснива се на Упутству за испитивање OECD 432 (2004).

1.1. УВОД

Фототоксичност се дефинише као токсична реакција на супстанцу примењену на организам која је или изазвана или појачана (јасна при нижим дозним нивоима) после накнадног излагања светлости или која је узрокована зрачењем коже после системске примене супстанце.

In vitro 3T3 NRU испитивање фототоксичности се користи за идентификовање фототоксичног потенцијала испитиване супстанце који је изазван побуђеном хемикалијом после експозиције светлу. Испитивање оцењује фото-цитотоксичност релативним смањењем у вијабилности ћелија које су изложене хемикалији у присуству светлости у односу на одсуство светлости. Супстанце које су идентификоване овим испитивањем су вероватно фототоксичне *in vivo* по системској примени и дистрибуцији у кожу или после површинске примене (локалне примене на кожу).

Многе врсте хемикалија су пријављене да изазивају фототоксичне ефекте[1, 2, 3, 4]. Њихово заједничко својство је њихова способност да апсорбују светлосну енергију у опсегу сунчеве светлости. Према првом закону фотохемије (закон Grotthaus-Draper), фотореакција захтева довољну апсорпцију квантума светлости. Због тога, пре разматрања биолошког испитивања, одређује се UV/vis апсорпциони спектар испитиване супстанце[XIV]. Предложено је да ако је моларни екстинкциони/ апсорпциони коефицијент мањи од 10 litre × mol^{-1} × cm^{-1} онда супстанца вероватно није фотореактивна. Такву хемикалију није неопходно испитивати *in vitro* 3T3 NRU испитивањем фототоксичности или било којим другим испитивањем за штетне фотохемијске ефекте[1, 5]. Видети Део други ове методе.

Поузданост и релевантност *in vitro* 3T3 NRU испитивања фототоксичности је недавно евалуирана[6, 7, 8, 9]. *In vitro* 3T3 NRU тест фототоксичности се показао предвидивим за акутне фототоксичне ефекте код животиња и људи *in vivo*. Тест није дизајниран да предвиди друге штетне ефекте који би се могли појавити из комбинованог дејства хемикалије и светлости, нпр. не односи се на фотогенотоксичност, фотоалергију или фотокарциногеност, нити дозвољава процену потенцијала фототоксичности. Тест није дизајниран да се односи на индиректне механизме фототоксичности, ефекте метаболита испитиване супстанце или ефекте смеша.

Како је употреба метаболишућих система општи захтев за све *in vitro* тестове за предвиђање генотоксичности и карциногеног потенцијала, до сада, у случају фототоксикологије, постоје само ретки примери када је потребна метаболичка трансформација за хемикалију да би се понашала као фотоотров *in vivo* или *in vitro*. Због тога се не сматра неопходним нити научно оправданим за овај тест да се изводи са системом метаболичке активације.

_____

XIV Према OECD TG 101

1.2. ДЕФИНИЦИЈЕ

Зрачење јесте интензитет упадног ултравиолетног (у даљем тексту: UV) или видљивог светла на површини, мерен у W/m^2 или mW/cm^2.

Доза светлости јесте количина (која је једнака производу интензитета и времена) UV или видљивог упадног зрачења на површини, изражен у џулима (= W × s) по јединци површине, нпр. J/m^2 или J/cm^2.

Таласне дужине UV светлости јесу ознаке које је препоручила CIE (Commission Internationale de L'Eclairage), и то су: UVA (315 nm до 400 nm), UVB (280 nm до 315 nm) и UVC (100 nm до 280 nm). Друге ознаке су такође у употреби: подела између UVB и UVA се често ставља на 320 nm, а UVA може бити подељена у UV-A1 и UV-A2 с поделом направљеном на око 340 nm

Виабилитет ћелија јесте параметар који мери укупну активност ћелијске популације (нпр. упијање виталне боје Neutral Red у ћелијске лизозоме), која у зависности од циљног показатеља испитивања који се мери и коришћеног дизајна испитивања корелира са укупним бројем и/или виталности ћелија

Релативни виабилитет ћелија јесте ћелијски виабилитет изражен у односу на негативне (растварач) контроле које су прошле цели експериментални поступак (+Irr или -Irr), али нису третиране са испитиваном хемикалијом.

Фотоиритацииони фактор (у даљем тексту: PIF) јесте фактор изведен упоређивањем две подједнако ефикасне цитотоксичне концентрације (IC_{50}) испитиване хемикалије добијене у одсуству (-Irr) и у присуству (+Irr) нецитотоксичног зрачења са UVA/vis светлошћу.

IC_{50} јесте концентрација испитиване хемикалије која смањује виабилност ћелија за 50%.

Средњи фотоефекат (у даљем тексту: MPE) јесте мера изведена из математичке анализе кривих концентрација одговор

добијених у одсуству (-Irr) и у присуству (+Irr) зрачења са UVA/vis светлошћу које није цититиксично.

Фототоксичност јесте акутна токсична реакција која је изазвана после првог излагања коже одређеним хемикалијама и накнадном излагању светлу или која је слично изазвана зрачењем коже после системске примене хемикалије.

1.3. ПРИНЦИП МЕТОДЕ

In vitro 3T3 NRU тест фототоксичности заснован је на поређењу цитотоксичности хемикалије, када се испитује у присуству и одсуству излагања нецитотоксичној дози симулиране сунчеве светлости. Цитотоксичност је у овом тесту изражена као смањење преузимања виталне боје, Neutral Red. Зависно од концентрације, када се мери 24 сата после третмана испитиваном хемикалијом и зрачења[10]. NR је слаба катјонска боја која лако продире кроз мембране ћелија не-дифузијом, акумулирајући се интрацелуларно у лизосомима. Промене у површини осетљиве лизосомалне мембране води до лизосомалне непостојаности и других промена које постепено постају иреверзибилне. Такве промене које су настале дејством ксенобиотика имају за последицу смањење преузимања и везивања NR. На овај начин се може направити разлика између виабилних, оштећених или мртвих ћелија, што је основа овог испитивања.

Balb/c 3T3 ћелије се одржавају у култури 24 сата да би се формирали монослојеви. Две посуде са 96 базенчића по испитиваној хемикалији се пре-инкубирају са осам различитих концентрација испитиване супстанце у трајању од 1 сата. Потом се једна од две посуде излаже највишој дози не-цитотоксичног зрачења док се друга посуда држи у мраку. Затим се у обе посуде медијум третмана замени медијумом за култивисање и после следећих 24 сата инкубације одређује се виабилитет ћелија преузимањем Neutral Red боје. Виабилитет ћелија се изражава као проценат од нетретираних контрола растварача и рачуна се за сваку испитивану концентрацију. Како би се предвидео потенцијал фототоксичности, пореде се концентрационе реакције добијене у присуству и у одсуству зрачења, обично при нивоу IC_{50}, тј. при концентрацији која смањује виабилитет ћелија до 50% у поређењу са нетретираним контролама.

1.4. ОПИС МЕТОДЕ

1.4.1. Припреме

1.4.1.1. Ћелије

Перманентна ћелијска линија мишјих фиробласта, Balb/c 3T3, клон 31, било из Колекције култура америчког типа (American Type Culture Collection, ATCC), Manassas, VA, USA или из Европске Колекције ћелијских култура (The European Collection of Cell Cultures, ECACC, Salisbury, Wiltshire, UK) коришћена је у студији валидације и зато се препоручује да се набаве из добро квалификованих депоа ћелија. Уз исти поступак испитивања могу се користити друге ћелије или ћелијске линије ако су услови култивисања прилагођени специфичним потребама ћелија, али се показује еквивалентност.

Ћелије се редовно проверавају на одсуство контаминације микоплазмом и користити једино ако ниједна микоплазма није пронађена[11].

Важно је да се редовно проверава осетљивост ћелија на UV према поступцима контроле квалитета које су описане у овој методи. Због тога што се UVA осетљивост ћелија може повећати с бројем пролаза, користи се Balb/c 3T3 ћелије најнижег броја пролаза који се може добити, најбоље мање од 100 (видети одељак 1.4.2.2.2. ове методе и Део трећи ове методе).

1.4.1.2. Медијум и услови култивисања

Одговарајући медијум за култивисање и услови култивације се користе за рутинске пролазе ћелија и током поступка испитивања, нпр. за ћелије Balb/c 3T3 они су DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) коме је додато 10% серума новорођеног говечета, 4 mM глутамина, пеницилин (100 IU) и стрептомицин (100 µg/mL), и влажна инкубација на 37° C, 5%–7,5% CO_2 у зависности од пуфера (видети одељак 1.4.1.4. други пасус ове методе). Нарочито је важно да услови култивисања ћелија обезбеде да време циклуса ћелија буде у оквиру нормалног историјског опсега ћелија или ћелијских линија које се користе.

1.4.1.3. Припремање култура

Ћелије из замрзнутих „stock" култура засеју се у медијум за култивисање при одговарајућој густини и субкултивишу најмање једном пре употребе у *in vitro* 3T3 NRU тесту фототоксичности.

Ћелије које се користе за тест фототоксичности посеју се у медијум за култивисање при одговарајућој густини тако да културе не достигну нагомилавање до краја теста, тј. када је виабилитет ћелија одређен 48 сати после засејавања ћелија. За ћелије Balb/c 3T3 које расту у посудама од 96 базенчића, препоручена густина засејавања ћелија је 1×10^4 ћелија по базенчићу.

За сваку испитивану супстанцу ћелије се засеју идентично у две одвојене посуде са 96 базенчића, који затим истовремено пролазе поступак испитивања под идентичним условима култивације осим за временски период када се једна посуда излаже зрачењу (+Irr) а друга се држи у мраку (-Irr).

1.4.1.4. Припрема испитиване супстанце

Испитиване супстанце се припремају свеже, одмах пре употребе осим уколико подаци показују њихову стабилност при чувању. Препоручује се да се целокупна припрема хемикалија и иницијални третман ћелија изведе под светлосним условима који би избегли фотоактивацију или деградацију испитиване супстанце испитиване супстанце пре зрачења.

Испитиване хемикалије се растворе у пуферованим растворима соли, нпр. Earle's Balanced Salt Solution (EBSS) или другом физиолошки избалансираном пуферском раствору који не садржи протеинске састојке, састојке који апсорбују

светлост (нпр. pH-идикаторке боје или витамини) како би се избегла интерференција током зрачења. Како се током зрачења ћелије држе око 50 минута ван CO_2 инкубатора, води се рачуна да се избегне алкализација. Ако се користе слаби пуфери као EBSS, ово се може постићи инкубирањем ћелија при 7,5% CO_2. Ако се ћелије инкубирају при само 5% CO_2, бира се јачи пуфер.

Испитиване хемикалије ограничене растворљивости у води растварају се у одговарајућем растварачу. Ако се користи растварач, он је присутан у константној запремини у свим културама, тј. у негативној контроли (контроли растварача) као и у свим концентрацијама испитиване супстанце и да не буде токсичан при тим концентрацијама. Концентрације испитиване супстанце бирају се тако да се избегне таложење или мутноћа раствора.

Препоручени растварачи су диметилсулфоксид (у даљем тексту: DMSO) и етанол (у даљем тексту: ETOH). Могу одговарати и други раствори ниске цитотоксичности. Пре употребе процењују се сви растварачи према специфичним својствима, нпр. реакција са испитиваном супстанцом, гушење фототоксичног ефекта, својства дејонизације радикала и/или хемијска стабилност у растварачу.

Мешање на вортексу и/или загревање до одговарајућих температура може да се користи како би се помогло растварање уколико ово не би имало утицаја на стабилност испитиване супстанце.

1.4.1.5. Услови зрачења

1.4.1.5.1. Извор светлости

Избор одговарајућег извора светлости и филтера је критичан фактор у испитивању фототоксичности. Светлост UVA и видљиве области обично се доводи у везу са фототоксичним одговорима *in vivo*[3, 12], док је генерално UVB од мањег значаја али је високо цитотоксична. Цитотоксичност се повећава 1.000 пута како таласна дужина иде од 313 nm до 280 nm[13]. Критеријуми за избор одговарајућег извора светлости укључују захтев да светлосни извор емитује таласне дужине које апсорбује испитивана супстанца (апсорпсиони спектар) и да доза светлости (која се може постићи у разумном времену излагања) буде довољна за детекцију познатих фотоцитотоксичних хемикалија. Таласне дужине и дозе које се користе не треба да прекомерно штете испитиваном систему, нпр. ослобађање топлоте (инфрацрвена област).

Симулација сунчеве светлости са соларним симулаторима сматра се оптималним вештачким извором светлости. Расподела снаге зрачења филтрираног соларног симулатора је приближна дневној светлости спољашњег простора која је дата у литератури[14]. Ксенонски лук и (допирани) жива-метал халогени лук се користе као соларни симулатори[15]. Друга има предност емитовања мање топлоте и што је јефтинија слагање са сунчевом светлошћу је мање идеална у поређењу са ксенонским луковима. Због тога што сви соларни симулатори емитују значајне количине UVB оне се одговарајуће филтрирају да би се пригушиле UVB таласне дужине високе цитотоксичности. Због тога што пластични материјали за култивисање ћелија садрже UV стабилизаторе спектар се мери кроз исти тип поклопца посуде са 96 базенчића као онај који ће се користити у тесту. Независно од мера предузетих да би се пригушили делови спектра филтрирањем или неизбежним филтерским ефектима опреме, спектар забележен испод ових филтера не треба да одступа од стандардизоване спољашње дневне светлости[14]. Пример дистрибуције спекралног зрачења филтрираног соларног симулатора коришћеног у студији валидације *in vitro* 3T3 NRU теста фототоксичности је дат у литератури[8, 16]. Видети Део трећи Слика 1. ове методе.

1.4.1.5.2. Дозирање

Интензитет светлости (зрачења) се редовно проверава пре сваког теста фототоскичности користећи одговарајући UV-метар широког опсега. Интензитет се мери преко истог типа поклопца посуде са 96 базенчића као што ће се користити у тесту. UV-метар је калибрисан према извору. Проверавају се карактеристике UV-метра и у ову сврху препоручује се употреба другог, референтног UV-метра исте врсте и иста калибрација. Идеално, при већим интервалима користи се спектрорадиометар за мерење спектралног зрачења филтрираног извора светлости и проверити калибрацију UV-метра широког опсега.

Доза од 5 J/cm^2 (као што је мерена у UVA опсегу) је одређена да не буде цитотоксична за ћелије Balb/c 3T3 и довољно јака да побуди хемикалије да изазову фототоксичну реакцију[6, 7] нпр. да постигне 5 J/cm^2 током временског периода од 50 минута зрачење је било подешено на 1,7 mW/cm^2. Видети Део трећи Слика 2. ове методе. Уколико се користи друга ћелијска линија или други светлосни извор, доза зрачења можда треба да се калибрише тако да начин дозирања може да буде изабран да није штетан за ћелије али да је довољан да побуди стандардне фотоотрове. Време излагања светлости се рачуна на следећи начин:

$$t(\text{min}) = \frac{\text{доза зрачења}\left(J/cm^2\right)\times 1000}{\text{зрачење}\left(mW/cm^2\right)\times 60}$$

(1 J = 1 Wsec)

1.4.2. Експериментални услови

1.4.2.1. Концентрације испитиване супстанце

Опсези концентрација испитиване хемикалије у присуству (+Irr) или у одсуству (-Irr) светлости адекватно се одређују у експериментима који су осмишљени за налажење опсега. Било би корисно прво проценити растворљивост и на 60 минута (или које време ће се користити) јер растворљивост може да се промени током времена или за време трајања експозиције. Да би се избегла токсичност која је узрокована неодговарајућим условима култивисања или високом киселошћу или алкалности хемикалије, pH ћелијских култура са додатом испитиваном супстанцом је у опсегу 6,5 до 7,8.

Највиша концентрација испитиване супстанце је у оквиру физиолошких услова испитивања, нпр. избегава се осмотски

или pH стрес. У зависности од испитиване хемикалије, можда је неопходно размотрити друга физикохемијска својства као ограничавајуће факторе за највишу испитивану концентрацију. За релативно нерастворне супстанце које нису токсичне при концентрацијама до тачке засићења испитује се највиша концентрација која се може постићи.

Избегава се таложење испитиване хемикалије при било којој испитиваној концентрацији. Максимална концентрација испитиване супстанце не прелази 1.000 µg/mL; осмолалност не прелази 10 mmolar. Користи се серија геометријских разблажења осам концентрација испитиване супстанце са константним фактором разблажења (видети одељак 2.1. други пасус ове методе).

Уколико постоје подаци (из експеримента налажења опсега) да испитивана супстанца није цитотоксична до границе концентрације у експерименту у мраку (-Irr), али је високо токсична када је озрачена (+Irr), опсег концентрација који се бира за (+Irr) експеримент може да се разликује од оног изабраног за (–Irr) експеримент да би испунио захтев адекватности квалитета података.

1.4.2.2. Контроле

1.4.2.2.1. Осетљивост ћелија на зрачење, успостављање историјских података

Ћелије се редовно проверавају (приближно сваког петог пролаза) на осетљивост према извору светлости проценом њихове виабилности по експозицији растућим дозама зрачења. У овој процени се користи неколико доза зрачења, укључујући нивое значајно веће од оних који се користе у 3T3 NRU тесту фототоксичности. Ове дозе се најлакше квантификују мерењима UV делова извора светлости. Ћелије се засаде при густини која се користи у *in vitro* 3T3 NRU тесту фототоксичности и зраче се следећег дана. Онда се одређује виабилитет ћелија дан касније коришћењем преузимања Neutral Red боје. Показује се да је настала највећа нецитотоксична доза (нпр. у студији валидације: 5 J/cm^2 (UVA)) била довољна да исправно класификује референтну хемикалију (Табела 1).

1.4.2.2.2. Осетљивост на зрачење, провера текућег теста

Испитивање задовољава критеријуме квалитета ако озрачене негативне контроле/контроле растварача покажу виабилитет већи од 80% у поређењу са неозраченом негативном контролом/контролом растварача.

1.4.2.2.3. Способност раста контрола растварача

Апсолутна оптичка густина ($OD_{540\ NRU}$) боје Neutral Red екстраховане из контроле растварача указује на то да ли је 1×10^4 ћелија које су засејане по базенчићу показало раст са нормалним временом удвостручавања током два дана теста. Испитивање задовољава критеријуме прихватања ако је средња вредност $OD_{540\ NRU}$ нетретираних контрола ≥ 0,4 (тј. приближно 20 пута већа од подлоге апсорбанције растварача).

1.4.2.2.4. Позитивна контрола

Позната фототоксична хемикалија се тестира истовремено са сваким *in vitro* 3T3 NRU тестом фототоксичности. Препоручује се хлорпромазин (у даљем тексту: CPZ). За CPZ који се тестира са стандардним поступком у *in vitro* 3T3 NRU тесту фототоксичности, одређени су критеријуми за прихватање теста: озрачен CPZ (+Irr): IC_{50}=0,1 до 2,0µg/ml, неозрачен CPZ (-Irr): IC_{50} = 7,0 до 90,0 µg/mL. Фото иритациони фактор (Photo Irritation Factor, PIF) је > 6. Прате се историјске карактеристике позитивне контроле.

Могу да се користе друге фототоксичне хемикалије, које одговарају за хемијску класу или карактеристике растворљивости хемикалије која се процењује, као истовремена позитивна контрола уместо хлорпромазина.

1.4.3. Поступак испитивања[6, 7, 8, 16, 17]

1.4.3.1. Први дан

Разделити 100 µL медијума за култивисање у периферне базенчиће посуде са 96 базенчића за микротитрацију ткивних култура (= слепе пробе). У преостале базенчиће, разделити 100 µL суспензије ћелија од 1×10^5 ћелија/mL у медијуму за култивисање (= 1×10^4 ћелија/базенчић). Две посуде се припремају за сваку серију појединачних концентрација испитиване супстанце и за контролу растварача и конпозитивну контролу.

Инкубирати ћелије 24 сата (видети одељак 1.4.1.2. ове методе) док не формирају полуконфлуентан монослој. Овај период инкубације дозвољава опоравак ћелија, адхеренцију и експоненцијални раст.

1.4.3.2. Други дан

После инкубације декантовати медијум културе од ћелија и испрати пажљиво са 150 µL пуферованог раствора који је коришћен за инкубацију. Додати 100 µL пуфера који садржи одговарајућу концентрацију испитиване супстанце или растварача (контрола растварача). Применити осам различитих концентрација испитиване хемикалије. Инкубатори ћелије са испитиваном супстанцом у мраку 60 минута (видети одељак 1.4.1.2. и одељак 1.4.1.4. други пасус ове методе).

Од две посуде припремљене за сваку серију концентрација испитиване супстанце и контрола, једна се изабере, обично насумично, за одређивање цитотоксичности (-Irr) (т.ј. контролна посуда) и једна (третирана посуда) за одређивање фототоксичности (+Irr).

За извођење +Irr експозиције, озрачити ћелије на собној температури 50 минута преко поклопца посудице са 96 базенчића са највишом дозом зрачења која није цитотоксична (видети Део трећи ове методе). Држати неозрачене посуде (-Irr) на собној температури у мрачној кутији 50 минута (= време излагања светлости).

Декантовати испитивани раствор и пажљиво испрати два пута са 150 µL пуферског раствора који је коришћен за инкубацију, али који не садржи испитивани материјал. Заменити пуфер са медијумом за култивацију и инкубирати (видети одељак 1.4.1.2. ове методе) преко ноћи (18 сати до 22 сата).

1.4.3.3. Трећи дан

1.4.3.3.1. Микроскопска процена

Ћелије се прегледају на раст, морфологију и интегритет монослоја користећи фазно контрасни микроскоп. Бележе се промене у морфологији ћелија и ефекти на ћелијски раст.

1.4.3.3.2. Тест преузимања боје Neutral Red

Испрати ћелије са 150 µL претходно загрејаног пуфера. Уклонити раствор за испирање нежним лупкањем. Додати 100 µL раствора Neutral Red (у даљем тексту: NR) (3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazin hidrohlorid, EINECS број 209-035-8; CAS број 553-24-2; C.I. 50040) концентрације 50 µg/mL у медијум без серума[16] и инкубирати као што је описано у одељку 1.4.1.2. ове методе током три сата. После инкубације, уклонити NR медијум и испрати ћелије са 150 µL пуфера. Декантовати и уклонити вишак пуфера упијањем или центрифугирањем.

Додати тачно 150 µL раствора за одстрањивање NR (свеже припремљен 49 делова воде + 50 делова етанола + 1 део сирћетне киселине).

Мешати посуду за микротитрацију нежно на мешалици 10 минута док се NR не екстрахује из ћелија и формира хомогени раствор.

Измерити оптичку густину екстракта NR на 540 nm на спектрофотометру према слепој проби. Сачувати податке у документу одговарајућег електронског формата за даљу анализу.

2. ПОДАЦИ

2.1. КВАЛИТЕТ И КВАНТИТЕТ ПОДАТАКА

Подаци испитивања омогућавају значајну анализу концентрације – одговора добијене у присуству и у одсуству зрачења и, ако је могуће, концентрацију испитиване хемикалије при којој је виабилност ћелија смањена на 50% (IC_{50}). Уколико се пронађе цитотоксичност и опсег концентрација и одсечак појединачних концентрација се постављају тако да омогуће подешавање криве према експерименталним подацима.

За јасно позитивне и за јасно негативне резултате (ведети одељак 2.3. први пасус ове методе), може да буде довољан примарни експеримент који је подржан једним или са више прелиминарних испитивања налажења опсега.

Двосмислени, гранични или нејасни резултати се разјашњавају даљим испитивањима (видети одељак 2.4. други пасус ове методе). У таквим случајевима разматра се измена експерименталних услова. Експериментални услови који се могу изменити укључују опсег концентрација или размак између концентрација, време пре-инкубације и време излагања зрачењу. Краће време излагања може да буде погодно за хемикалије нестабилне у води.

2.2. ПРОЦЕНА РЕЗУЛТАТА

Да би се омогућила оцена резултата, може се рачунати фото-иритациони фактор (Photo-Irritation-Factor, PIF) или средњи фото-ефекат (Mean Photo Effect, MPE).

За израчунавање мера фототоксичности (видети испод) потребно је апроксимовати скуп појединачних вредности концентрација – одговор помоћу одговарајуће непрекидне (модел) криве концентрација – одговор. Подешавање криве према подацима обично се изводи не-линеарном регресивном методом[18]. Да би се проценио утицај варијабилности података на подешавање криве, препоручује се поступак bootstrap.

Фото-иритациони фактор (у даљем тексту: PIF) израчунава се употребом формуле:

$$PIF = \frac{IC50(-Irr)}{IC50(+Irr)}$$

Ако се IC_{50} у присуству и у одсуству светлости не може израчунати, PIF се не може одредити за испитивани материјал. Средњи фото-ефекат (у даљем тексту: MPE) одређује се на основу упоређивања завршених концентрација – одговор кривих.

$$MPE = \frac{\sum_{i=1}^{n} wiPEci}{\sum_{i=1}^{n} wi}$$

Фото-ефекат PEc при било којој концентрацији C се дефинише као производ одговора ефекта REc и дозе ефекта DEc тј. PEc = REc × DEc. Одговор ефекта REc је разлика између одговора примећеног у одсуству и у присуству светлости, тј. REc = Rc (-Irr) − Rc (+Irr). Доза-ефекат се даје као:

$$DEc = \frac{C/C*-1}{C/C*+1}$$

При чему C* јесте равнотежна концентрација, односно концентрација при којој је +Irr одговор једнак −Irr одговору при

концентрацији C. Ако се C* не може одредити зато што су вредности одговора +Irr криве систематски више или ниже него R_C(-Irr), дозни ефекат је 1. Фактори wi су дати по највишој вредности одговора, тј. wi = MAX {R_i (+Irr), R_i (-Irr)}. Концентрација C_i се бира тако да исти број тачака припадне сваком концентрационом интервалу који су дефинисани са вредности концентрације при којој најмање једна или две криве и даље показују вредност одговора од најмање 10%. Ако је ова максимална концентрација виша од највише концентрације која је коришћена у +Irr експерименту, онда се резидуални део +Irr криве подешава да је вредност одговора „0”. У зависности од тога да ли је MPE вредност већа од одређене cut-off вредности (MPE_C = 0,15) или није, хемикалија се класификује као фототоксична.

Софтверски пакет за израчунавање PIF и MPE је доступан[20].

2.3. ТУМАЧЕЊЕ РЕЗУЛТАТА

На основу студије валидације[8], испитивана супстанца са PIF < 2 или са MPE < 0,1 предвиђа: „није фототоксично”. Ако је PIF > 2 и < 5 или ако је MPE > 0,1 и < 0,15 предвиђа: „вероватна фототоскичност”; и ако је PIF > 5 или MPE > 0,15 предвиђа: „фототоксичност”.

За лабораторије које уводе овај тест, испитују се референтни материјали набројани у Табели 1. пре испитивања испитиване супстанце за процену фототоксичности. Вредности PIF и MPE су приближне вредностима поменутим у Табели 1.

Табела 1.

Хемијски назив	EINECS број	CAS број	PIF	MPE	Апсорпциони максимум	Растварач[XV] (1)
амиодарон HCL	243-293-2	[19774-82-4]	> 3,25	0,2-0,54	242 nm 300 nm	етанол
хлорпромазин HCL	200-701-3	[69-09-0]	> 14,4	0,33-0,63	309 nm	етанол
норфлоксацин	274-614-4	[70458-96-7]	> 71,6	0,34-0,90	316 nm	ацетонитрил
антрацен	204-371-1	[120-12-7]	> 18,5	0,19-0,81	356 nm	ацетонитрил
Протопорфирин IX, динатријум	256-815-9	[50865-01-5]	> 45,3	0,54-0,74	402 nm	етанол
L-хистидин		[7006-35-1]		0,05-0,10	211 nm	вода
хексахлорофен	200-733-8	[70-30-4]	1,1-1,7	0,00-0,05	299 nm 317 nm	етанол
Натријум-лаурил сулфат	205-788-1	[151-21-3]	1,0-1,9	0,00-0,05	Нема апсорпције	вода

_____

XV Растварач који се користи за мерење апсорбанције.

2.4. ТУМАЧЕЊЕ РЕЗУЛТАТА

Фототоксични ефекти се уочавају само при највишим испитиваним концентрацијама (нарочито за испитиване хемикалије које су растворне у води). Додатна разматрања могу бити неопходна за процену хазарда. Ово може укључити податке о апсорпцији коже и о акумулацији хемикалије у кожи и/или податке из других тестова, нпр. испитивање хемикалије на *in vitro* животињској или људској кожи или моделима коже.

Ако није показана токсичност (+Irr и -Irr) и ако је слаба растворљивост била ограничавајући фактор за концентрације које могу бити испитане, може се довести у питање компатибилност испитиване супстанце са тестом и разматра се потврдно тестирање употребом нпр. другог модела.

3. ИЗВЕШТАЈ

Извештај о испитивању садржи податке о:

1) Испитиваној супстанци:

– подаци о идентификацији, уобичајени генерички називи и IUPAC и CAS бројеви, ако су познати;

– физичка природа и чистоћа;

– физичка и хемијска својства релевантна за извођење студије;

– UV/vis апсорпциони спектар;

– стабилност и фотостабилност, ако је позната.

2) Растварачу:

– оправдање за избор растварача;

– растворљивост испитиване хемикалије у растварачу;

– проценат присуства растварача у медијуму за третман.

3) Ћелијама:

– врста и извор ћелија;

– одсуство микоплазме;

– број ћелијских пролаза, ако је познат;

– осетљивост ћелија на зрачење, одређена опремом за зрачење која се користи у *in vitro* 3T3 NRU тесту фототоксичности.

4) Условима испитивања[1]; инкубацији пре и после третмана:

– врста и састав медијума за култивисање;

– услови инкубације (концентрација CO_2; температура; влажност);

– трајање инкубације (предтретман, пост-третман).

5) Условима испитивања2; третману хемикалијом:

– основа за избор концентрација испитиване хемикалије које су коришћене у присуству и у одсуству зрачења;

– у случају ограничене растворљивости испитиване хемикалије и одсуства цитотоксичности: основа за највишу испитивану концентрацију;

– врста састава медијума за третирање (пуферовани раствор соли);

– трајање хемијских третмана.

6) Условима испитивања[3]; зрачењу:

– основа за избор извора светлости који је коришћен;

– произвођач и врста извора светлости и радиометра;

– карактеристике спектралног зрачења извора светлости;

– трансмисионе и апсорпционе карактеристике коришћених филтера;

– карактеристике радиометра и појединости о калибрацији;

– размак светлосног извора од испитиваног система;

– UVA зрачење при овом размаку, изражено у mW/cm^2;

– трајање излагања UV/vis светлости;

– UVA доза (зрачење × време), изражена у J/cm^2;

– температура ћелијских култура током зрачења и ћелијских култура које се истовремено држе у мраку.

7) Условима испитивања[4]; Neutral Red тесту виабилности:

– састав Neutral Red медијума за третирање;

– трајање инкубације са Neutral Red;

– услови инкубације (концентрација CO_2; температура; влажност);

– услови екстракције Neutral Red (екстракција; трајање);

– таласна дужина која је коришћена за спектрофотометријско читање оптичке густине Neutral Red;

– друга таласна дужина (референтна), ако је коришћена;

– садржај слепе пробе спектрофотометра, ако је коришћена.

8) Резултатима:

– виабилност ћелија добијена из сваке концентрације испитиване хемикалије, изражена у проценту виабилности од средње вредности истовремене контроле растварача;

– криве концентрација – одговор (концентрација испитиване супстанце према релативној виабилности ћелија) добијене у истовременим +Irr и –Irr испитивањима;

– анализа кривих концентрација – одговор: ако је могуће, израчунавање IC_{50} (+Irr) и IC_{50} (-Irr);

– упоређивање две криве концентрација – одговор добијене у присуству и у одсуству зрачења, било рачунањем фото-иритационог фактора (PIF), било рачунањем средњег фото-ефекта (MPE);

– критеријуми за прихватање теста; истовремена контрола растварача;

– апсолутна виабилност (оптичка густина екстракта Neutral Red) озрачених и неозрачених ћелија;

– историјски подаци негативне и контроле растварача; средње вредности и стандардне девијације;

– критеријуми за прихватање теста; истовремена позитивна контрола;

– IC_{50}(+Irr) и IC_{50}(-Irr) и PIF/MPE хемикалије која је коришћена као позитивна контрола;

– историјски подаци о хемикалији која је коришћена као позитивна контрола: IC_{50}(+Irr) и IC_{50}(-Irr) и PIF/MPE; средње вредности и стандардне девијације.

9) Образложењу резултата.

10) Закључцима.

4. ЛИТЕРАТУРА

1. Lovell W.W., (1993) A scheme for *in vitro* screening of substances for photoallergenic potential. Toxicology *In vitro* 7, p. 95-102.

2. 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.

3. Spielmann, H., Lovell, W.W., Hölzle, E., Johnson, B.E., Maurer, T., Miranda, M.A., Pape, W.J.W., Sapora, O., and Sladowski, D., (1994) *In vitro* phototoxicity testing: The report and recommendations of ECVAM Workshop 2. ATLA, 22, p. 314-348.

4. Spikes, J.D., (1989) Photosensitisation. In 'The science of Photobiology' Edited by K.C. Smith. Plenum Press, New York. 2nd edition, p. 79-110.

5. 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.

6. Spielmann, H., Balls, M., Döring, B., Holzhütter, H.G., Kalweit, S., Klecak, G., L'Eplattenier, H., Liebsch, M., Lovell, W.W., Maurer, T., Moldenhauer. F. Moore. L., Pape, W., Pfannbecker, U., Potthast, J., De Silva, O., Steiling, W., and Willshaw, A., (1994) EEC/COLIPA project on *in vitro* phototoxicity testing: First results obtained with a Balb/c 3T3 cell phototoxicity assay. Toxic. *In vitro* 8, p. 793-796.

7. 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.

8. 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., Lovell, W.W., Maurer, T., Pfannenbecker, U., Potthast, J. M., Csato, M., Sladowski, D., Steiling, W., and Brantom, P., (1998) The international EU/COLIPA *In vitro* phototoxicity validation study: results of phase II (blind trial), part 1: the 3T3 NRU phototoxicity test. Toxicology *In vitro* 12, p. 305-327.

9. OECD, (2002) Extended Expert Consultation Meeting on The *In vitro* 3T3 NRU Phototoxicity Test Guideline Proposal, Berlin, 30th-31th October 2001, Secretariat's Final Summary Report, 15th March 2002, OECD ENV/EHS, available upon request from the Secretariat.

10. Borenfreund, E., and Puerner, J.A., (1985) Toxicity determination *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption. Toxicology Lett., 24, p. 119-124.

11. Hay, R.J., (1988) The seed stock concept and quality control for cell lines. Analytical Biochemistry 171, p. 225-237.

12. 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.

13. 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, p. 1825-1829.

14. ISO 10977., (1993) Photography – Processed photographic colour films and paper prints – Methods for measuring image stability.

15. Sunscreen Testing (UV.B) TECHNICALREPORT, CIE, International Commission on Illumnation, Publication No 90, Vienna, 1993, ISBN 3 900 734 275

16. ZEBET/ECVAM/COLIPA – Standard Operating Procedure: *In vitro* 3T3 NRU Phototoxicity Test. Final Version, 7 September, 1998. p. 18.

17. Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W.J.W., De Silva, O., Holzhütter, H.G., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, 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.

18. Holzhütter, H.G., and Quedenau, J., (1995) Mathematical modeling of cellular responses to external signals. J. Biol. Systems 3, p. 127-138.

19. 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.

20. http://www.oecd.org/document/55/0,2340,en_2649_34377_2349687_1_1_1_1,00.html

Део други

Улога 3T3 NRU PT у приступу корак по корак за испитивање фототоксичности хемикалија

Део трећи

Слика 1: Расподела спектралне моћи филтрираног соларног симулатора

(Видети одељак 1.4.1.5. други пасус ове методе)

Слика 1. даје пример прихватљиве расподеле спектралног зрачења филтрираног соларног симулатора. Он је од пуњеног метал халофеног извора који је коришћен у проби валидације 3T3 NRU PT[6, 8, 17]. Приказани су ефекат два различита филтера и додатни ефекат филтрирања поклопца посуде са 96 базенчића. Филтер H2 је коришћен само са тест системима који могу да толеришу већу количину UVB (тест модела коже и тест фото-хемолизе еритроцита). У 3T3 NRU PT коришћен је H1 филтер. Слика показује да је додатни ефекат филтрирања поклопца посуде углавном уочен у опсегу UVB, али и даље остављајући довољно UVB спектар зрачења да се побуде хемикалије које типично апсорбују UVB опсег, као што је амјодарон (видети Табелу 1).

Слика 2: Осетљивост на зрачење Balb/c 3T3 ћелија (измерено у опсегу UVA)

Виабилност ћелија (% преузимања Neutral Red од стране контрола у мраку)

(Видети одељак 1.4.1.5.2. други пасус и одељке 1.4.2.2.1. и 1.4.2.2.2. ове методе)

Осетљивост Balb/c 3T3 ћелија на зрачење са соларним симулатором који је коришћен у проби валидације 3T3 NRU теста фототоксичности, мерена у UVA опсегу. Слика показује резултате добијене у седам различитих лабораторија у превалидационој студији[1]. Због тога што су обе криве са отвореним знаковима добијене са остарелим ћелијама (велики број пролаза), оне су морале да буду замењене новим са задебљаним ознакама које показују прихватљиву толеранцију на зрачење, које су добијене на новим ћелијама. Из ових података изведена је највиша доза зрачења која није токсична, од 5 J/cm^2. Хоризонтална испрекидана линија додатно показује максимално прихватљив ефекат зрачења дат у одељку 1.4.2.2. ове методе.

B.42. СЕНЗИБИЛИЗАЦИЈА КОЖЕ: ТЕСТ ЛОКАЛНИХ ЛИМФНИХ ЧВОРОВА

1. МЕТОДА ИСПИТИВАЊА

Ова експериментална метода заснива се на Упутству за испитивање OECD 429 (2002).

1.1. УВОД

Тест локалних лимфних чворова (Local Lymph Node Assay, у даљем тексту: LLNA) је у довољној мери проверен и прихваћен да се оправда његово прихватање као нове методе[1, 2, 3]. Ово је друга метода за оцењивање потенцијала хемикалије да изазове сензибилизацију коже код животиња. Друга метода (Метода B.6. која је дата у овом прилогу) користи заморце, пре свега тест максимизације и Buehlerov тест[4].

LLNA даје алтернативну методу за идентификацију хемикалија које изазивају сензибилизацију коже и за потврђивање да хемикалије немају значајан потенцијал да узрокују сензибилизацију коже. Ово не значи да се LLNA увек користи уместо испитивања на заморцима, већ пре да је овај тест једнако добар и да може бити примењен као алтернатива у којој позитивни и негативни резултати углавном не захтевају даљу потврду.

LLNA пружа одређене предности у односу на научни напредак и добробит животиња. Тест проучава фазу индукције сензибилизације коже и даје квантитативне податке погодне за процену односа доза-одговор. Детаљи валидације LLNA и преглед рада у вези с тим су објављени[5, 6, 7, 8]. Благи/умерени сензибилизатори који су препоручени као погодне супстанце за позитивну контролу за тестове на заморцима такође су погодни за коришћење у LLNA[6, 8, 9].

LLNA је *in vivo* метода и не елиминише коришћење животиња у оцењивању активности контактне сензибилизације. Она има потенцијал да смањи број животиња који је потребан за ову сврху. LLNA нуди значајно побољшање у начину на који се животиње користе за тестирање контактне сензибилизације. LLNA се заснива на разматрању имунолошких појава које су стимулисане хемикалијама за време индукционе фазе сензибилизације. За разлику од испитивања на заморцима, LLNA не захтева примену оспораваних дермалних реакција преосетљивости. Ова метода не захтева коришћење адјуванса, као што је случај код теста максимизације на заморцима. Због тога LLNA смањује стрес код животиња. Упркос предностима ове методе у односу на традиционалне тестове на заморцима, постоје одређена ограничења која могу захтевати традиционална

испитивања на заморцима (нпр. лажно негативни резултати LLNA са неким металима, лажно позитивни резултати са неким иритансима коже)[10].

Видети Општи увод.

1.2. ПРИНЦИП МЕТОДЕ

Основни принцип у LLNA је да сензибилишуће супстанце доводе до примарне пролиферације лимфоцита у лимфном чвору који дренира место примене хемикалије. Ова пролиферација је пропорционална примењеној дози (и потенцији алергена) и представља једноставно средство за добијање објективне, квантитативне мере сензибилизације. LLNA процењује ову пролиферацију као однос доза-одговор у којем се пролиферација у испитиваним групама упоређује са оном код контрола третираних растварачем. Однос пролиферације у третираним групама према онима у контролама растварача, названа „индекс стимулације", одређује се и мора да буде најмање три, пре него што се испитивана супстанца даље оцењује као потенцијално сензибилишућа за кожу. Овде описане методе заснивају се на коришћењу радиоактивног обележавања како би се измерила пролиферација ћелија. Други показатељи испитивања за оцењивање пролиферације могу се применити уколико постоји оправдање и одговарајућа научна подршка, укључујући потпуне наводе и опис методологије.

1.3. ОПИС МЕТОДЕ

1.3.1. Припреме

1.3.1.1. Услови смештаја и исхране

Животиње се смештају појединачно. Температура просторије за експерименталне животиње је 22º C (±3º C). Релативна влажност је најмање 30% и не прелази 70% осим за време чишћења просторија. Циљна влажност је 50% до 60%. Светло је вештачко са секвенцама од 12 сати светла и 12 сати мрака. Може да се користи конвенционална лабораторијска исхрана уз слободан приступ води за пиће.

1.3.1.2. Припрема животиња

Животиње се бирају насумце и означавају да би се омогућила идентификација јединки (али не означавањем ушију на било који начин) и држе се у кавезима најмање пет дана пре почетка дозирања како би се аклиматизовале на лабораторијске услове. Пре почетка третмана све животиње се прегледају да се утврди да немају видљивих лезија на кожи.

1.3.2. Услови испитивања

1.3.2.1. Експериментална животиње

За овај тест користи се миш. Испитивање се изводи на младим одраслим женкама мишева соја CBA/Ca или CBA/J, које нису раније рађале и нису гравидне. На почетку студије животиње треба да буду између 8 и 12 недеља старе и варијација у телесној маси животиња треба да буде минимална и не сме да прелази 20% просечне телесне масе. Други сојеви и мужјаци могу се користити када се прикупи довољно података да се покаже да не постоје значајне разлике у LLNA одговору између одређених сојева и/или полова.

1.3.2.2. Провера поузданости

Позитивне контроле се користе како би се показала одговарајућа својства теста и компетентност лабораторије да успешно обави студију. Позитивна контрола доводи до позитивног LLNA одговора при нивоу експозиције за који се очекује да повећање индекса стимулације (SI) > 3 у односу на негативну контролну групу. Доза позитивне контроле бира се тако да индукција буде јасна али не прекомерна. Пожељно је применити супстанце: хексил цинамин алдехид (CAS број 101-86-0, EINECS број 202-983-3) и меркаптобензотиазол (CAS број 149-30-4, EINECS број 205-736-8). Могу постојати околности у којима се, уз довољно оправдање, могу користити друге контролне супстанце које задовољавају горе наведене критеријуме. Група позитивне контроле може бити потребна у сваком тесту, могу постојати ситуације у којима ће лабораторије имати историјске податке позитивне контроле који показују конзистентност задовољавајућег ефекта током шестомесечног или дужег периода. У тим случајевима може бити погодно ређе тестирање с позитивним контролама у периодима краћим од 6 месеци. Мада се позитивна контролна супстанца испитује у вехикулуму за које је познато да изазива конзистентан одговор (нпр. ацетон: маслиново уље), може доћи до неких прописаних ситуација у којима ће бити потребно тестирање нестандардног вехикулума (клинички/хемијски релевантна формулација). У таквим ситуацијама се испитује могућа интеракција позитивне контроле са овим неконвенционалним вехикулумом.

1.3.2.3. Број животиња, дозни нивои и избор вехикулума.

Испитивање се врши на најмање четири животиње по дозној групи, са најмање три концентрације испитиване супстанце, плус група негативне контроле која се третира само вехикулумом за испитивану супстанцу и, ако одговара, позитивна контрола. У случајевима у којима се прикупљају подаци о појединачним животињама, користи се најмање пет животиња по дозној групи. Осим у случају одсуства третмана испитиваном супстанцом, са животињама у контролној групи се поступа на исти начин као и са животињама у третираним групама.

Избор дозе и вехикулума је заснован на препорукама из литературе1. Дозе се бирају из низа концентрација: 100%, 50%, 25%, 10%, 5%, 2,5%, 1%, 0,5%, итд. Када су доступни, разматрају се постојећи подаци о акутној токсичности и иритацији коже приликом избора три узастопне концентрације тако да највећа концентрација максимизује излагање уз избегавање системске токсичности и прекомерне локалне иритације коже[2, 11].

Вехикулум се бира на основу максимизације испитиваних концентрација и растворљивости уз прављење раствора/суспензије која одговара за примену испитиване супстанце. Препоручени вехикулуми (наведени од више ка мање

одговарајућим) су ацетон/маслиново уље (4:1 v/v), диметилформамид, метил етил кетон, пропилен гликол и диметил сулфоксид[2, 10], али се могу користити и други уз задовољавајуће научно образложење. У одређеним ситуацијама може да буде неопходно да се користи клинички релевантни растварач или комерцијална формулација у којој се испитивана супстанца ставља на тржиште као додатна контрола. Посебна пажња се посвећује да се обезбеди да се хидрофилни материјали инкорпорирају у систем вехикулума, који влажи кожу и не скида се тренутно. Избегавају се потпуно водени вехикулуми.

1.3.3. Поступак испитивања

1.3.3.1. Експериментални распоред

Експериментални распоред студије:

Дан 1:

Појединачно се идентификују животиње и бележи се телесна маса сваке животиње. Започиње се апликацију 25 µл одговарајућег раствора испитиване супстанце, самог вехикулума или позитивне контроле (како је одговарајуће) на полеђину сваког уха.

Дани 2 и 3:

Понавља се поступак апликације који је примењен дана 1.

Дани 4 и 5:

Без третмана.

Дан 6:

Бележи се телесна маса сваке животиње. Убризгава се 250 µl раствора соли са фосфатним пуфером (у даљем тексту: PBS) која садржи 20 µCi (7.4e + 8 Bq) 3H – метил тимидина свим испитиваним и контролним мишевима путем репне вене. Алтернативно се убризгава 250 µl PBS који садржи 2 µCi (7.4e + 7 Bq) 125I јододеоксиуридина и 10-5 M флуородеоксиуридина свим мишевима путем репне вене.

После пет сати животиње се лишавају живота на хуман начин. Исеку се ушни дренажни лимфни чворови сваког уха и сакупљају у PBS за сваку експерименталну групу (приступ збирне третиране групе). Алтернативно се могу исећи парови лимфних чворова појединачних животиња и ставити у PBS за сваку животињу (индивидуални приступ). Детаљи и дијаграми идентификације чворова и дисекције дати су у литератури[10].

1.3.3.2. Припрема суспензија ћелија

Једна суспензија ћелија лимфних чворова (у даљем тексту: LNC) од збирних третираних група или обострано од појединачних животиња припрема се нежним механичким раздавањем кроз газу од нерђајућег челика мрежице 200 µm. Ћелије лимфног чвора два пута се испирају с преосталим PBS и таложе са 5% трихлорсирћетном киселином (у даљем тексту: TCA) на 4° C током 18 сати[2]. Зрнца се поновно суспендују у 1 ml TCA и преносе у сцинтилацијске бочице које садрже 10 ml сцинтилационе течности за ^{3}H-бројање или се директно преносе у епрувете за гама бројење за ^{125}I-пребројавање.

1.3.3.3. Одређивање пролиферације ћелија (инкорпорирана радиоактивност)

Инкорпорирање 3H-метил тимидина се мери β-сцинтилационим бројањем као распадање по минути (у даљем тексту: DPM). Инкорпорирање ^{125}I-јододеоксиуридина се мери 1^{25}I-бројањем и изражава као DPM. Зависно од приступа, додавање се изражава као DPM/третирана група (приступ збирне третиране групе) или DPM/животиња (индивидуални приступ).

1.3.3.4. Запажања

1.3.3.4.1. Клиничка запажања

Животиње се пажљиво прегледају једном дневно због клиничких знакова, било локалне иритације на месту апликације или због системске токсичности. Сва запажања се систематично бележе у појединачним документима који се воде за сваку животињу.

1.3.3.4.2. Телесна маса

Како је наведено у одељку 1.3.3.1. ове методе индивидуалне телесне масе животиња се мере на почетку испитивања и приликом планираног лишавања живота на хуман начин животиња.

1.3.4. Израчунавање резултата

Резултати су изражени као индекс стимулације (у даљем тексту: SI). Када се користи приступ збирне третиране групе, SI се добија дељењем збирне радиоактивне инкорпорације за сваку третирану групу са инкорпорацијом збирне групе контроле вехикулума. На овај начин се добија средњи SI. Приликом коришћења индивидуалног приступа, SI се добија дељењем средње DPM/животиња унутар сваке групе испитиване супстанце и групе позитивне контроле средњом DPM/ животиња за контролну групу растварача/вехикулума. Средњи SI за контроле третиране вехикулумом је тада 1.

Коришћење индивидуалног приступа за израчунавање SI омогућава статистичку анализу података. Приликом избора одговарајуће методе статистичке анализе истраживач води рачуна о могућим неједнакостима варијанси и другим релевантним проблемима који могу да захтевају трансформацију података или непараметарске статистичке анализе. Адекватни приступ за

интерпретацију података је да се оцене сви индивидуални подаци третираних и контрола вехикулума и да се из њих изведе најбоља крива доза – одговор, узимајући у обзир границе поузданости[8, 12, 13]. Истраживач води рачуна о могућим „неподобним" реакцијама код појединих животиња унутар групе које могу захтевати коришћење алтернативне мере одговора (нпр. медиана, а не средња вредност) или елиминацију неподобних резултата.

Процес доношења одлука у погледу позитивног одговора укључује индекс стимулације ≥ 3 заједно са разматрањем односа доза-одговор и, када одговара, статистички значај[3, 6, 8, 12, 14].

Уколико је неопходно разјаснити добијене резултате, разматрају се разна својства испитиване супстанце, укључујући и то да ли има структурне сличности са супстанцама за које је познато да су сензибилишуће за кожу, да ли узрокује прекомерну иритацију коже и природу опаженог односа дозе и одговора. Ова и друга питања детаљно су разматрана на другом месту[7].

2. ПОДАЦИ

Подаци се наводе табеларно. Наводе се средње и појединачне DPM вредности и индекси стимулације за сваку дозну групу (укључујући контролу вехикулума).

3. ИЗВЕШТАЈ

Извештај о испитивању, уколико је могуће, садржи податке о:

1) Испитиваној супстанци:

– идентификациони подаци (нпр. CAS број, уколико је доступан; извор; чистоћу; познате нечистоће; број серије);

– физичку природу и физичка и хемијска својства (нпр. испарљивост, стабилност, растворљивост);

– у случају смеше, састав и релативна заступљеност (проценат) састојака.

2) Вехикулуму:

– идентификациони подаци (чистоћа; концентрација, где одговара; коришћена запремина);

– оправдање за избор вехикулума.

3) Експерименталним животињама:

– сој коришћених мишева;

– микробиолошки статус животиња, када је познат;

– број, старост и пол животиња;

– извор животиња, услови смештаја, исхрана, итд.

4) Условима испитивања:

– детаљи о припреми испитиване супстанце и примени;

– оправдање за избор дозе, укључујући резултате студије распона, уколико је обављена; коришћен вехикулум и концентрације испитиване супстанце и укупна количина примењене супстанце;

– детаљи о квалитету хране и воде (укључујући врсту исхране/извор, извор воде).

5) Контроли поузданости:

– сажетак резултата задње провере поузданости укључујући податке о супстанци, концентрацији и коришћеном вехикулуму;

– подаци о истовременој и/или историјској позитивној и негативној контроли за лабораторију која врши испитивање.

6) Резултатима:

– појединачна телесна маса животиња на почетку дозирања и у време планираног лишавања живота на хуман начин;

– табела средњих (приступ збирне третиране групе) и индивидуалних (индивидуални приступ) DPM вредности као и распон вредности за оба приступа и стимулациони индекси за сваку дозну групу (укључујући контролу вехикулума);

– статистичка анализа, кад то одговара;

– време појаве и знаци токсичности, укључујући иритацију коже на месту примене, уколико их има, за сваку животињу.

7) Образложењу резултата:

– кратак коментар резултата, анализа односа доза – одговор и статистичке анализе, када одговара, са закључком да ли се испитивана супстанца сматра сензибилишућом за кожу.

4. ЛИТЕРАТУРА

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, 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, 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, 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, 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, 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: employement of a regression method that includes determination of uncertainty margins. Toxicology, 146, 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 podraživačs in the maximisation, Buehler and local lymph node assays. Food and Chemical Toxicology, 31, 63-67.

13. Basketter D.A., Lea L.J., Dickens A., Briggs D., Pate I., Dearman R.J., Kimber I. (1999). A comparison of statistical approaches to the derivation of EC3 values from local lymph node assay dose responses. J. Appl. Toxicology, 19, 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, 344-48.

B.43. СТУДИЈА НЕУРОТОКСИЧНОСТИ КОД ГЛОДАРА

1. МЕТОДА ИСПИТИВАЊА

Ова метода заснива се на Упутству за испитивање OECD 424 (1997).

Метода испитивања је осмишљена за добијање података потребних за потврду или даљу карактеризацију потенцијалне неуротоксичности хемикалија код одраслих животиња. Може се комбиновати са постојећим методама испитивања за студије токсичности поновљене дозе или обављати као посебна студија. Препоручује се консултација OECD водича[1] око помоћи при осмишљавању студије засноване на овој методи испитивања. Наведено је посебно важно код разматрања модификација опажања и поступака испитивања као што се препоручује за рутинску примену ове методе. Припремљен је документ са смерницама како би омогућио избор других поступака испитивања за употребу у посебним околностима.

Процена развојне неуротоксичности није предмет ове методе.

1.1. УВОД

У процени и евалуацији токсичних карактеристика хемикалија важно је узети у обзир потенцијал за неуротоксичне ефекте. Метода за системску токсичност, поновљена доза већ укључује посматрања која се односе на потенцијалну неуротоксичност. Ова метода испитивања може се користити при осмишљавању студије за добијање даљих података о или за потврду неуротоксичних ефеката опажених у студијама за системске токсичност, поновљена доза. Разматрање потенцијалне неуротоксичности одређених група хемикалија може указати на то да се оне могу одговарајуће оценити овом методом без претходних индикација потенцијалне неуротоксичности из студија системске токсичности, поновљена доза. Таква разматрања нпр. укључују:

– посматрање неуролошких знакова или неуропатолошких лезија у студијама токсичности различитих од оних из студија системску токсичност, поновљена доза или

– структурну везу или друге податке који их повезују са познатим неуротоксикантима.

Може да буде и других случајева у којима је коришћење ове методе испитивања прикладно (за детаље видети литературу[1]).

Ова метода је развијена да се прилагоди да задовољи посебне потребе за потврдом специфичне хистопатолошке и бихевиоралне неуротоксичности хемикалије, као и да обезбеди карактеризацију и квантификацију неуротоксичних реакција.

У прошлости се неуротоксичност изједначавала са неуропатијом укључујући неуропатолошке лезије или неуролошке дисфункције као што су напади, парализа или тремор. Иако је неуропатија важна манифестација неуротоксичности, јасно је да постоје многи други знаци токсичности за нервни систем (нпр. губитак моторне координације, дефицити чула, дисфункције учења и памћења) који се не морају осликавати у неуропатији или другим врстама студија.

Метода испитивања неуротоксичности је осмишљена да детектује главне неуробихевиоралне и неуропатолошке ефекте код одраслих глодара. Бихевиорални ефекти, чак и одсуству морфолошких промена, могу да одржавају штетни утицај на организам, али нису све бихевиоралне промене специфичне за нервни систем. Због тога, било које промене које су опажене оцењују се у вези са корелативним хистопатолошким, хематолошким или биохемијским подацима као и са подацима о другим типовима системске токсичности. Испитивање које се обавља у овој методи је усмерено на давање карактеризације и квантификације неуротоксичних ефеката што укључује специфичне хистопатолошке и бихевиоралне поступке који могу бити надаље подржани електрофизиолошким и/или биохемијским истраживањима[1, 2, 3, 4].

Неуротоксиканти могу да делују на бројна циљна места у оквиру нервног система и путем различитих механизама. Ниједан систем испитивања не може у потпуности да процени неуротоксични потенцијал свих супстанци, па може бити корисно искористити друга *in vivo* или *in vitro* испитивања која су специфична за тип опажене или предвиђене неуротоксичности.

Ова метода испитивања може да се користи заједно са смерницама датим у OECD водичу[1] како би се осмислиле студије чија је намера да даље карактеришу или повећају осетљивост квантификације односа доза-одговор како би боље оценили дозу без штетног ефекта или потврдили познату или вероватну опасност од хемикалије. Могу се осмислити студије које идентификују и оцењују неуротоксични механизам (механизме) или поткрепљују већ расположиве податке коришћењем поступака неуробихевиоралне и неуропатолошке опсервације. Такве студије не копирају податке који би били генерисани коришћењем стандардних поступака препоручених у овој методи. Подаци су већ доступни и нису неопходни за тумачење резултата студије.

Метода испитивања неуротоксичности, кад се примењује сама или у комбинацији, даје резултате који могу:

– да идентификују да ли је нервни систем трајно или реверзибилно под утицајем испитиване хемикалије;

– да допринесу карактеризацији промена нервног система које се повезују са излагањем хемикалији и разумевању релевантног механизма;

– да одреде односе доза – одговор и време – одговор како би се проценила доза без штетног ефекта (која се може користити при успостављању безбедносних критеријума за хемикалију).

Ова експериментална метода користи оралну примену испитиване супстанце. Други путеви примене (нпр. дермални или инхалациони) могу бити прикладнији и могу захтевати модификацију препоручених поступака. Разматрања о избору пута примене зависе од профила људског излагања и расположивих токсиколошких или кинетичких информација.

1.2. ДЕФИНИЦИЈЕ

Штетни ефекат јесте било која промена у односу на основно стање која је повезана са третманом и која умањује способност организма да преживи, размножава се или се прилагоди животној средини.

Доза јесте количина примењене испитиване супстанце. Доза се изражава као маса (g, mg) или као маса испитиване супстанце по јединици масе експерименталне животиње (нпр. mg/kg) или као константна концентрација у храни (ppm).

Дозирање јесте општи појам који се састоји од дозе, њене фреквенције и трајања дозирања.

Неуротоксичност јесте штетна промена у структури или функцији нервног система која је последица излагања хемијском, биолошком или физичком агенсу.

Неуротоксикант јесте било која хемикалија, биолошки или физички агенс који има потенцијал да узрокује неуротоксичност.

NOAEL јесте скраћеница за дозу без штетног ефекта (no-observed-adverse effect level) и представља највиши ниво дозе при коме нису опажени штетни ефекти повезани са третманом.

1.3. ПРИНЦИП МЕТОДЕ

Испитивана супстанца се примењује оралним путем у распону доза на неколико група лабораторијских глодара. Обично су потребне поновљене дозе и режим дозирања може бити 28 дана, субхронично (90 дана) или хронично (1 година или дуже). Поступци описани у овој експерименталној методи могу се користити и у студији акутне неуротоксичности. Испитивање на животињама врши се како би се омогућила детекција или карактеризација бихевиоралних и/или неуролошких абнормалности. Распон понашања на које утичу неуротоксиканти процењује се током периода посматрања. На крају испитивања, подгрупа животиња оба пола из сваке групе узоркује се in situ и припремају се и испитују пресеци мозга, кичмене мождине и периферних нерава.

Током извођења студије као самосталне студије за скрининг неуротоксичности или за карактеризацију неуротоксичних ефеката, животиње у свакој групи које се не користе за узорковање и каснија хистопатолошка испитивања (видети Табелу 1.) могу бити коришћене за специфичне неуробихевиоралне, неуропатолошке, неурохемијске или електрофизиолошке поступке који могу заменити податке добијене стандардним испитивањима које захтева ова метода[1]. Ови додатни поступци могу бити посебно корисни када емпиријска посматрања или очекивани ефекти указују на специфичну врсту или циљно место неуротоксичности хемикалије. Преостале животиње се могу користити за процене као што су оне која захтевају методе испитивања за студије токсичности, поновљена доза код глодара.

Кад се поступци из ове методе испитивања комбинују са онима из других метода, потребан је довољан број животиња како би се задовољили захтеви за посматрања из обе студије.

1.4. ОПИС МЕТОДЕ

1.4.1. Избор животињске врсте

Препоручена врста глодара је пацов, мада се уз оправдање могу користити и друге врсте. Користе се уобичајени лабораторијски сојеви здравих младих одраслих животиње. Користе се женке које нису раније рађале и које нису трудне. Дозирање се уобичајено почиње што је раније могуће после одбијања од сисе, најбоље не касније него што животиње наврше шест недеља и у сваком случају пре него животиње наврше девет недеља. Када се ова студија комбинује са другим студијама, ова старост се може прилагодити. На почетку студије варијација у телесној маси животиња не сме да прелази ± 20% средње масе за сваки пол. Када се обавља краткорочна студија поновљене дозе као прелиминарна дугорочној студији, у обе студије се користе животиње истог соја и из истог извора.

1.4.2. Услови смештаја и исхране

Температура просторија за експерименталне животиње је 22º C (± 3 ºC). Релативна влажност је најмање 30% и да не прелази 70% осим за време чишћења просторија. Циљна влажност је 50% до 60%. Светло је вештачко са секвенцама од 12 сати светла и 12 сати мрака. Бука се смањује на минимум. Може се користити конвенционална лабораторијска исхрана уз неограничене количине воде за пиће.

Избор исхране може бити условљен потребом да се обезбеди одговарајућа смеша испитиване супстанце која се примењује овом методом. Животиње се смештају појединачно или се држе у малим групама истог пола.

1.4.3. Припрема животиња

Здраве младе животиње се случајним избором распоређују у групе. Кавези се распоређују на начин да се сведу на минимум могући ефекти због њиховог распореда. Животиње се јединствено идентификују и држе у кавезима најмање пет дана пре почетка испитивања како би се аклиматизовале на лабораторијске услове.

1.4.4. Пут примене и припрема доза

Ова метода испитивања посебно се односи на оралну примену испитиване супстанце. Орална примена може бити путем присилног храњења, путем хране, воде за пиће или капсулама. Други путеви примене (нпр. дермални или инхалациони) могу се користити али захтевају модификацију препоручених поступака. Разматрања о избору пута примене зависе од профила излагања људи и расположивих токсиколошких или кинетичких података. Назначава се објашњење за избор пута примене као и модификације поступака ове методе испитивања.

Кад је неопходно, испитивана супстанца се може растворити или суспендовати у одговарајућем вехикулуму. Препоручује се коришћење воденог раствора/суспензије као први избор, затим разматрање примене раствора/суспензије у уљу (нпр. кукурузно уље) и затим могући раствори/суспензије у другом вехикулуму. Токсичне карактеристике вехикулума морају бити познате. Разматрају се и следеће карактеристике вехикулума: ефекти вехикулума на апсорпцију, расподелу, метаболизам или задржавање испитиване супстанце који могу изменити њене токсичне карактеристике; као и ефекте уноса хране или воде или нутритивни статус животиња.

1.5. ПОСТУПЦИ

1.5.1. Број и пол животиња

Када се студија изводи као посебна студија, користи се најмање 20 животиња (10 женки и 10 мужјака) у свакој дозној и контролној групи за оцењивања детаљних клиничких и функционалних опажања. Од најмање пет мужјака и пет женки одабраних од тих 10 мужјака и 10 женки, узимају се узорци in situ и исти се користе за детаљну неурохистопатологију на крају студије. У случајевима када се на знакове неуротоксичних ефеката посматра само ограничен број животиња у датој дозној групи, разматра се да се те животиње укључе међу оне одабране за узорковање. Када се студија обавља у комбинацији са студијом токсичности са поновљеном дозом, користи се одговарајући број животиња како би се задовољили циљеви обе студије. Минимални број животиња по групи за разне комбинације испитивања је приказан у Табели 1. Уколико се планирају лишавања живота на хуман начин током испитивања или уколико се планирају групе за опоравак за посматрање реверзибилности, перзистенције или одложене појаве токсичних ефеката после третмана или када се разматрају додатна посматрања, број животиња се повећава како би се обезбедило да буде доступан довољан број животиња потребних за посматрање и хистопатологију.

1.5.2. Третирана и контролна група

Користи се најмање три дозне и једну контролну групу, али уколико се из процене других података не очекују ефекти при поновљеној дози од 1.000 mg/kg телесна маса/дан, може се обавити испитивање граничне дозе. Уколико нема расположивих одговарајућих података, може се извести студија тражења распона као помоћ при одређивању доза које би се

користиле. Осим третирања испитиваном супстанцом, са животињама у контролној групи се поступа исто као са онима из испитиване групе. Уколико се при примени испитиване супстанце користи вехикулум, контролна група прима вехикулум у највећој запремини која се користи.

1.5.3. Провера поузданости

Лабораторија која обавља студију наводи податке којима доказује своју могућност да изведе испитивање и осетљивост коришћених поступака. Такви подаци пружају доказе о могућности детекције и квантификације, како одговара, променама у различитим показатељима испитивања препорученим за посматрање, као што су аутономни знаци, сензорска реактивност, снага хватања и моторна активност. Подаци о хемикалијама који узрокују различите врсте неуротоксичних ефеката и који се могу користити као супстанце позитивне контроле налазе се у литератури[2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9]. Историјски подаци могу се користити уколико кључни аспекти експерименталних поступака остану исти. Периодично ажурирање историјских података се препоручује. Нови подаци који показују непрекидну осетљивост поступака треба да буду развијени када се промени неки кључни елемент извођења испитивања или поступка од стране лабораторије.

1.5.4. Избор доза

Нивои доза се бирају узимајући у обзир било коју раније уочену токсичност и расположиве кинетичке податке за испитивано једињење или сличне материјале. Највиша доза се бира са циљем изазивања неуротоксичних ефеката или јасних системских токсичних ефеката. Потом се бира опадајући низ дозних нивоа са циљем доказивања било ког одговора који је у вези са дозом и NOAEL при најнижем дозном нивоу. Дозе се одређују тако да примарни токсични ефекти на нервни систем могу да се разликују од ефеката који се повезују са системском токсичношћу. Два до три интервала су често оптимум и поред четврте испитиване групе, често се препоручује да се користе врло велики интервали (нпр. више од фактора 10) између доза. Када постоји добра процена људске изложености, то се такође узима у обзир.

1.5.5. Испитивање граничне дозе

Уколико студија коришћењем једне дозе од најмање 1.000 mg/kg ТМ/дан, коришћењем описаних поступака, не покаже никакве неуротоксичне ефекте, и ако се токсичност не може очекивати на основу података о структурно сличним једињењима, студија у којој би се користиле три дозе не сматра се неопходном. Очекивана изложеност људи може индиковати потребу за коришћењем веће оралне дозе у испитивању граничне дозе. За друге путеве примене као што су инхалација или дермална примена, физичка и хемијска својства испитиване супстанце често могу диктирати максимални ниво излагања. За извођење студије акутне оралне токсичности, доза за испитивање граничне дозе је најмање 2.000 mg/kg.

1.5.6. Примена доза

Животиње се свакодневно дозирају испитиваном супстанцом, седам дана недељно, током периода од најмање 28 дана. Коришћење петодневног режима дозирања или краћег излагања треба да буде оправдано. Кад се испитивана супстанца примењује присилним храњењем, исто се чини у једној дози коришћењем трбушне цеви или одговарајућом интубационом канулом. Максимална запремина течности који може бити примењена зависи од величине експерименталне животиње. Запремина не сме да прелази 1 ml/100 g ТМ. Ипак, у случају водених раствора може се узети у обзир коришћење до 2 ml/100 g ТМ. Осим код иритативних и корозивних супстанци које ће уобичајено показати интензивније ефекте при вишим концентрацијама, варијабилност у испитиваној запремини се минимизује подешавањем концентрације како би се осигурао константна запремина при свим нивоима дозе.

За супстанце које се примењују путем хране или воде за пиће, важно је осигурати да количине испитиване супстанце не ометају нормалну прехрану или равнотежу воде. Када се испитивана супстанца примењује у храни било као константна прехрамбена концентрација (ppm) или када се користи константи дозни ниво у смислу телесне масе животиња, алтернатива се назначава. За супстанце које се примењују присилним храњењем, доза се примењује у слично време сваког дана и прилагођена је како би се задржао константан дозни ниво у смислу телесне масе животиње. Када се користи испитивање са поновљеном дозом као претходно испитивање за дугорочну студију, онда се у обе студије користи слична прехрана. За студије акутне токсичности ако није могуће дати једну дозу, доза се може давати у мањим деловима током периода који не прелазе 24 сата.

1.6. ПОСМАТРАЊА

1.6.1. Учесталост посматрања и испитивања

Код студија са поновљеном дозом, период посматрања покрива период дозирања. Код студија акутне токсичности, посматра се 14-дневни период после третмана. Код животиња у пратећим групама које се држе без излагања за време после третмана, посматрања покрива и овај период.

Посматрања се обављају довољно често како би се повећала вероватност детекције било којих бихевиоралних и/или неуролошких абнормалности. Посматрања се обављају по могућству у исто време сваког дана узимајући у обзир период у коме се очекује појава ефеката после дозирања. Фреквенција клиничких посматрања и функционалних тестова је дата у Табели 2. Уколико кинетички или други подаци који су добијени у претходним студијама указују на потребу посматрања у другачијим периодима, усваја се алтернативни распоред како би се прикупио максималан број информација. Даје се објашњење за промену распореда.

1.6.1.1. Посматрања општег здравственог стања и морталитета/морбидитета

Здравствено стање свих животиња пажљиво се посматра најмање једном дневно, а два пута дневно посматрају се морталитет и морбидитет.

1.6.1.2. Детаљна клиничка посматрања

На животињама које су изабране за ту сврху обављају се детаљна клиничка опажања (видети Табелу 1) једном пре првог излагања (како би се омогућила упоређивања код једне јединке) и у различитим интервалима у зависности од трајања студије (видети Табелу 2). Детаљна клиничка посматрања на пратећим групама обављају се на крају периода опоравка. Детаљна клиничка опажања се обављају изван кавеза у стандардној арени. Опажања се пажљиво бележе коришћењем система оцењивања који укључује критеријуме или скале за сваку меру. Лабораторија јасно дефинише критеријуме или скале. Треба уложити напор како би се обезбедило да варијације у условима испитивања буду минималне (не систематично повезане са третманом) и да посматрања обављају обучени посматрачи који нису упознати са третманом.

Препоручљиво је структуирано обављати посматрања по добро дефинисаним критеријума (укључујући дефиницију „нормалног распона") и систематично их применити на сваку животињу у сваком периоду посматрања. „Нормални распон" се адекватно документује. Бележе се сви уочени знакови. Кад год је могуће бележи се и величина уочених знакова. Клиничка опажања укључују, али нису ограничена на, промене на кожи, крзну, очима, слузницама, појава секрета и екскрета и аутономне активности (нпр. лакримација, пилоерекција, величина зенице, необичан начин дисања и/или дисање на уста, било које необичне знакове уринирања или дефекације и безбојни урин).

Бележе се и било који неуобичајени ефекти у погледу положаја тела, нивоа активности (нпр. повећано или смањено истраживање стандардне арене) и координације покрета. Промене у држању (нпр. клађење, атаксија), ставу (нпр. погрбљеност) и реакцији на поступање, смештање или други стимулуси околине као и присуство клоничних или тоничних покрета, конвулзија или тремора, стереотипа (нпр. претерано тимарење, необични покрети главе, понављајуће кретње у круг) или чудно понашање (нпр. грижење или претерано лизање, самосакаћење, ход уназад, вокализација) или агресија такође се бележе.

1.6.1.3. Функционална испитивања

Слично детаљним клиничким посматрањима, функционална испитивања се такође обављају пре излагања, као и често после тога, на свим животињама које су изабране за ту сврху (видети Табелу 1). Учесталост функционалних испитивања такође зависи од трајања студије (видети Табелу 2). Поред периода посматрања из Табеле 2, обављају се функционална испитивања на пратећим групама све до усмрћења. Функционална испитивања укључују сензорну реактивност на стимулусе разних врста (нпр. звучни, визуелни и проприоцептивни стимулуси[5, 6, 7] оцењивање снаге стиска[8] и оцењивање моторне активности[9]). Моторна активност се мери аутоматском справом којом је могуће детектовати смањену и повећану активност. Уколико се користи други дефинисани систем, он је квантитативан и његову осетљивост и поузданост треба показати. Сваки уређај се тестира како би се осигурала поузданост током времена и конзистентност између уређаја. Више детаља о поступцима који се прате налази се у литератури. Уколико нема података (нпр. структура – активност, епидемиолошки подаци, друге студије токсичности) који би указивали на потенцијалне неуротоксичне ефекте, разматра се укључивање специјализованијих тестова сензорне или моторне функције или учења и памћења како би се детаљније проучили ти могући ефекти. Више података о специјализованим тестовима дато је у литератури[1].

Изузетно, животиње које показују знакове токсичности у обиму који значајно омета функционално испитивање могу бити изостављене из тог испитивања. Даје се оправдање за искључивање тих животиња из функционалног испитивања.

1.6.2. Телесна маса и потрошња хране/воде

За студије које трају до 90 дана све животиње се мере најмање једном недељно и мери се потрошња хране (потрошњу воде када се испитивана супстанца уноси тим путем) такође најмање једном недељно. За дугорочне студије све животиње се мере најмање једном недељно првих 13 недеља, а потом најмање једном на сваке 4 недеље. Мери се потрошња хране (потрошњу воде када се испитивана супстанца уноси тим путем) такође најмање једном недељно током првих 13 недеља, а касније у приближно тромесечним интервалима осим уколико здравствено стање или промена телесне масе не налажу другачије.

1.6.3. Офталмолошка испитивања

За студије које трају дуже од 28 дана обавља се офталмолошки преглед уз коришћење офталмоскопа или сличног одговарајућег инструмента, пре примене испитиване супстанце и по завршетку студије, најбоље на свим животињама, али најмање на онима из група високе дозе и из контролне групе.

Уколико се примете промене у очима или уколико клинички знаци указују на потребу, прегледају се све животиње. Код дугорочних студија офталмолошки преглед се обавља у 13. недељи. Офталмолошки прегледи се не обављају уколико су ови подаци већ доступни из других студија сличног трајања и сличних дозних нивоа.

1.6.4. Хематолошка и медицинско-биохемијска испитивања

Када се изводи студија неуротоксичности у комбинацији са студијом системске токсичности са поновљеном дозом, раде се хематолошка испитивања и медицинско-биохемијска одређивања како је изложено у методи испитивања системске токсичности. Прикупљање узорака се обавља тако да било који потенцијални ефекти на неуропатологију буду сведени на минимум.

1.6.5. Хистопатолошка испитивања

Неуропатолошки преглед је осмишљен тако да допуни и прошири опажања из *in vivo* фазе студије. Ткива најмање 5 животиња/пол/група (видети Табелу 1. и следећи пасус овог одељка) се фиксирају in situ, коришћењем општепризнатих техника перфузије и фиксације (видети литературу[3, 4]). Било које уочљиве промене се бележе. Кад се студија изводи као самостална студија за проверу неуротоксичности или за карактеризацију неуротоксичних ефеката, преостале животиње могу

бити коришћене било за специфичне неуробихевиоралне[10, 11], неуропатолошке[10, 11, 12, 13], неурохемијске[10, 11, 14, 15] или електрофизиолошке[10, 11, 16, 17] поступке као допуна поступцима и испитивањима који су овде описани или за повећање броја јединки прегледаних за хистопатологију. Ови додатни поступци су од посебне користи кад емпиријска опажања или очекивани ефекти указују на специфични тип или циљно место неуротоксичности[2, 3]. Алтернативно, преостале животиње могу да се подвргну рутинском патолошком оцењивању како је описано у методи за студије са поновљеном дозом.

Општи поступак бојења као што је хематоксилин и еозин (у даљем тексту: H&E) обавља се за све узроке ткива у парафину и изводи се микроскопски преглед. Уколико се уоче знаци периферне неуропатије или ако се на исте сумња, испитују се узорци периферног нервног ткива у пластици. Клинички знаци такође могу назначити додатна места за испитивање или коришћење посебних поступака бојења. Упутство о додатним местима дато је у литератури[3, 4]. Одговарајуће специјалне боје за показивање специфичних типова патолошких промена могу бити од помоћи[18].

На репрезентативним пресецима централног и периферног нервног система врши се хистолошки преглед (видети у литератури[3,4]). Испитивана подручја обично укључују: предњи мозак, средиште церебрума, укључујући пресек кроз хипокампус, средњи мозак, церебелум, понс, продужена мождина, око са оптичким нервом и ретином, кичмену мождину и цервикална и лумбална задебљања, дорзални корен ганглиа, дорзална и вентрална влакна коренова, проксимални ишијасни нерв, проксимални тибијални нерв (у колену) и гране тибијалног нерва за мишић листа. Пресеци кичмене мождине и периферних нерава укључују и попречне или трансверзалне и уздужне пресеке. Обраћа се пажња на васкулатуру нервног система. Узорак скелетног мишића, посебно мишића листа, такође се прегледа. Посебна пажња се обраћа местима са целуларном или фиброзном структуром и узорак CNS и PNS за који се зна да је посебно погођен неуротоксикантима.

Смернице о неуропатолошким променама које типично произилазе из излагања токсиканту дате су у литератури[3, 4]. Препоручује се постепено испитивање узорака ткива у коме се пресеци групе високе дозе прве упоређују са онима из контролне групе. Уколико се не уоче неуропатолошке промене у узорцима из ових група, даља анализа није потребна. Уколико се уоче неуропатолошке промене у групи високе дозе, узорак сваког потенцијално погођеног ткива из средњих и нижих дозних група кодира се и редом испитује.

Уколико се пронађу било какве неуропатолошке промене у квалитативној анализи, обавља се друго испитивање на свим подручјима нервног система који показују такве промене. Пресеци из свих дозних група свих потенцијално захваћених регија се кодирају и испитују насумце без познавања кода. Фреквенца и озбиљност сваке лезије се бележе. Пошто се оцене све регије из свих група код се може дешифровати и може се обавити статистичка анализа како би се оценио однос доза-одговор. Примери различитих степена озбиљности сваке лезије се описују.

Неуропатолошки налази се оцењују у контексту бихејвиоралних посматрања и мерења, као и других података из претходних и истовремених студија системске токсичности испитиване супстанце.

2. ПОДАЦИ

2.1. ОБРАДА РЕЗУЛТАТА

Наводе се појединачни подаци. Сви подаци се наводе табеларно. За сваку испитивану или контролну групу наводе се: број животиња на почетку испитивања, број животиња које су пронађене мртве за време испитивања или усмрћене из хуманих разлога, као и време смрти или хуманог лишавања живота на хуман начин, број који показује знакове токсичности, опис знакова токсичности који су уочени, укључујући време настанка, трајање, врсту и озбиљност било којих токсичних ефеката, број животиња које показују лезије, укључујући врсту и озбиљност лезија.

2.2. ПРОЦЕНА И ТУМАЧЕЊЕ РЕЗУЛТАТА

Налази студије се процењују у погледу инциденце, озбиљности и корелације неуробихевиоралних и неуропатолошких ефеката (неурохемијских или електрофизиолошких ефеката такође, уколико су укључена додатна испитивања) или било којих других уочених штетних ефеката. Када је могуће, нумерички резултати се процењују одговарајућом пштеприхваћеном статистичком методом. Статистичке методе се бирају приликом осмишљавања студије.

3. ИЗВЕШТАЈ

Извештај о испитивању садржи податке о:

1) Испитиваној супстанци:

– физичка природа (укључујући изомерију, чистоћу и физичка и хемијска својства);

– идентификациони подаци.

2) Вехикулуму (ако одговара):

– оправдање за избор вехикулума.

3) Експерименталним животињама:

– коришћена врста/сој;

– број, старост и пол животиња;

– извор, услови смештаја, аклиматизација, исхрана, итд.;

– појединачне масе животиња на почетку испитивања.

4) Условима испитивања:

– детаљи о формулацији испитиване супстанце/припрема исхране, постигнута концентрација, стабилност и хомогеност препарата:

– спецификација примењених доза, укључујући детаље о вехикулуму, запремини и физичком облику примењеног материјала;

– детаљи о примени испитиване супстанце;

– образложење за изабране нивое доза;

– образложење за пут примене и трајање излагања;

– конверзија концентрације испитиване супстанце (ppm) из исхране/воде за пиће у стварну дозу (mg/kg телесна маса / дан), уколико је примењиво;

– детаљи о квалитету хране и воде.

5) Поступцима испитивања и посматрања:

– детаљи о сврставању животиња сваке групе у подгрупе за перфузију;

– детаљи о систему бодовања, укључујући критеријуме и скале за свако мерење у детаљним клиничким посматрањима;

– детаљи о функционалним испитивањима за сензорну реактивност на стимулусе различитих врста (нпр. звучни, визуелни и проприоцептивни), за оцењивање снаге стиска, за оцењивање моторне активности (укључујући детаље о аутоматским справама за детекцију активности), и другим коришћеним поступцима;

– детаљи о офталмолошким прегледима и ако одговара хематолошким испитивањима и медицинско-биохемијским испитивањима са релевантним основним вредностима;

– детаљи специфичних неуробихевиоралних, неуропатолошких, неурохемијских или електрофизиолошких поступака.

6) Резултатима:

– телесна маса/промене телесне масе, укључујући телесну масу при лишавању живота на хуман начин;

– потрошња хране и воде, уколико је применљиво;

– подаци о токсичним ефектима по полу и дозном нивоу, укључујући знаке токсичности или смртност;

– природа, озбиљност и трајање (време настанка и каснији ток) детаљних клиничких налаза (пролазних или не);

– детаљан опис свих резултата функционалних испитивања;

– налази обдукције;

– детаљан опис свих специфичних неуробихевиоралних, неуропатолошких, неурохемијских или електрофизиолошких налаза, уколико је применљиво;

– подаци о апсорпцији и метаболизму, уколико су доступни;

– статистичка обрада резултата, кад је примењиво.

7) Образложењу резултата:

– податке о ефекту дозе;

– однос других токсичних ефеката до закључка о неуротоксичном потенцијалу испитиване супстанце;

– доза без штетног ефекта (NOAEL).

8) Закључку:

– препоручује специфичан извештај о целокупној неуротоксичности испитиване хемикалије.

4. ЛИТЕРАТУРА

1. OECD Giudance Document on Neurotoxicity Testing Strategies and Test Methods. OECD, Paris, InPreparation.

2. Test Guideline for a Developmental Neurotoxicity Study, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals.In preparation.

3. World Health Organisation (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) Neuopathology as a screen for Neurotoxicity Assessment. J. Amer. Coll. Toxicol., 10, p. 689-695.

13. Moser, V.C., Anthony, D.C., Sette, W.F. and MacPhail, R.C., (1992) Comparison of Subchronic Neurotoxicity of 2-Hydroxyethyl Acrylate and Acrylamide in Rats. Fund. Appl.Toxicol., 18, p. 343-352.

14. O'Callaghan, J.P. (1988). Neurotypic and Gliotypic Proteins as Biochemical Markers of Neurotoxicity. Eurotoxicol. Teratol., 10, p. 445-452.

15. O'Callaghan J.P. and Miller, D.B., (1988) Acute Exposure of the Neonatal Rat to Triethyltin Results in Persistent Changes in Neurotypic and Gliotypic Proteins. J. Pharmacol. Exp. Ther., 244, p. 368-378. L 142/428 EN Official Journal of the European Union 31.5.2008

16. Fox. D.A., Lowndes, H.E. and Birkamper, G.G., (1982) Electrophysiological Techniques in Neurotoxicology. In: Nervous System Toxicology. Mitchell, C.L. ed. Raven Press, New York, p. 299-335.

17. Johnson, B.L., (1980) Electrophysiological Methods in neurotoxicity Testing. In: Experimental and Clinical Neurotoxicology. Spencer, P.S. and Schaumburg, H.H. eds., Williams and Wilkins Co.,. Baltimore/ London, p. 726-742.

18. Bancroft, J.D. and Steven A., (1990) Theory and Pratice of Histological Techniques. Chapter 17, Neuropathological Techniques. Lowe, James and Cox, Gordon eds. Churchill Livingstone.

Табела 1: Минимални број животиња по групи када се студија неуротоксичности изводи одвојено или у комбинацији с другим студијама

	СТУДИЈА НЕУРОТОКСИЧНОСТИ СПРОВЕДЕНА КАО			
	Посебна студија	Комбинована са 28-дневном студијом	Комбинована са 90-дневном студијом	Комбинована са студијом хроничне токсичности
Укупан број животиња по групи	10 мужјака и 10 женки	10 мужјака и 10 женки	15 мужјака и 15 женки	25 мужјака и 25 женки
Број животиња одабраних за функционална испитивања укључујући детаљно клиничко посматрање	10 мужјака и 10 женки	10 мужјака и 10 женки	10 мужјака и 10 женки	10 мужјака и 10 женки
Број животиња одабран за узорковање in situ и неурохистопатологију	5 мужјака и 5 женки	5 мужјака и 5 женки	5 мужјака и 5 женки	5 мужјака и 5 женки
Број животиња одабран за посматрања токсичности поновљене дозе/ субхроничне/хроничне, хематологију, медицинску биохемију, хистопатологију, итд. како је назначено у Водичу		5 мужјака и 5 женки[XVI]	10 мужјака[XVI] 10 женки [XVI]	20 мужјака[XVI] 20 женки [XVI]
Додатна посматрања, када је одговарајуће	5 мужјака и 5 женки			

Табела 2: Фреквенца клиничког посматрања и функционалних испитивања

Врста посматрања	Трајање студије

		Акутно	28-дана	90-дана	Хронично
Код свих животиња	Опште здравствено стање	дневно	дневно	дневно	дневно
	Морталитет / морбидитет	Два пута дневно	Два пута дневно	Два пута дневно	Два пута дневно
Код животиња одабраних за функционална посматрања	Детаљна клиничка посматрања	– пре првог излагања – 8 сати после дозирања у очекивано време највећег ефекта – на дан 7 и 14 после дозирања	– пре првог излагања – после тога једном недељно	– пре првог излагања – једном за време прве или друге недеље излагања – после тога месечно	– пре првог излагања – једном на крају првог месеца излагања – после тога свака три месеца
	Функционална испитивања	– пре првог излагања – 8 сати после дозирања у очекивано време највећег ефекта – на дан 7 и 14 после дозирања	– пре првог излагања – за време четврте недеље третмана што је могуће ближе крају периода излагања	– пре првог излагања – једном за време прве или друге недеље излагања – после тога месечно	– пре првог излагања – једном на крају првог месеца излагања – после тога свака три месеца

_____

XVI Укључује пет животиња одабраних за функционална испитивања и детаљно клиничко посматрање као део студије неуротоксичности.

B.44. АПСОРПЦИЈА ПРЕКО КОЖЕ: *IN VIVO* МЕТОДА

1. МЕТОДА ИСПИТИВАЊА

Ова метода заснива се на Упутству за испитивање OECD 427 (2004).

1.1. УВОД

Експозиција многим хемикалијама се дешава углавном путем коже док се већина студија изводи на лабораторијским животињама пероралном применом. *In vivo* испитивање перкутане апсорпције наведено у овој смерници обезбеђује везу која је неопходна за екстраполацију из студија оралне токсичности када се ради процена безбедности после дермалне експозиције.

Супстанца пролази велики број слојева ћелија коже пре него што доспе у циркулацију. За већину супстанци слој који ограничава брзину пролаза кроз кожу је stratum corneum који се састоји од мртвих ћелија. Пермеабилност кроз кожу зависи како од липофилности хемикалије тако и од дебљине спољашњег слоја епидермиса, као и од фактора као што су молекулска маса и концентрација супстанце. Углавном је кожа пацова и зечева пермеабилнија од људске, док је пермеабилоност коже заморчића и мајмуна сличнија људској.

Методе за мерење перкутане апсорпције могу да се поделе у две категорије: *in vivo* и *in vitro*. *In vivo* метода може да обезбеди добре податке о апсорпцији кроз кожу код различитих врста.

Недавно су развијене *in vitro* методе. Оне користе транспорт кроз цео или делимични слој животињске или људске коже у резервоар са течношћу. *In vitro* метода се описује у посебној методи испитивања[1]. Препоручује се да се користи OECD водич[2] као помоћ у избору одговарајуће методе испитивања апсорпције кроз кожу за дату ситуацију с обзиром да се у овом водичу налазе детаљи о погодности како *in vitro* тако и *in vivo* метода.

In vivo метода описана у овој методи омогућује одређивање пенетрације испитиване супстанце кроз кожу у системски одељак. Ова техника се широко користи током више година[3, 4, 5, 6, 7]. Иако у многим случајевима *in vitro* студије перкутане апсорпције могу да буду погодне, постоје многе ситуације у којима само *in vivo* студије могу да обезбеде неопходне податке.

Предност *in vivo* методе је да користи физиолошки и метаболички интактан систем, користи врсте уобичајене за многе студије токсичности и може да се модификује за примену на другим врстама. Недостаци су коришћење живих животиња, потреба за коришћењем радиоактивно обележеног материјала да би се добили поуздани резултати, тешкоће у одређивању ране фазе апсорпције и разлике у пермеабилности коже врста која се најчешће користи (пацова) и коже човека.

Животињска кожа је углавном пермеабилнија и због тога на основу ових испитивање може да се прецени апсорпција кроз кожу човека[6, 8, 9]. Кауситичне/корозивне супстанце се не испитују на живим животињама.

1.2. ДЕФИНИЦИЈЕ

Неапсорбована доза представља дозу која је испрана са површине коже после експозиције и део који је присутан на неоклузивном покривачу, укључујући и дозу за коју је показано да је испарила са коже током испитивања.

Апсорбована доза (*in vivo*) обухвата дозу која се налази у урину, у испирку кавеза, фецесу, издахнутом ваздуху (ако је мерено), крви, ткивима (ако су сакупљана) и у лешу животиње после уклањања дела коже на коју је примењена супстанца.

Апсорбабилна доза представља дозу у или на кожи после испирања.

1.3. ПРИНЦИП МЕТОДЕ

Испитивана супстанца (пожељно је да буде радиоактивно обележена) примењује се на ошишану кожу животиња у једном или више дозних нивоа у облику репрезентативних препарата у употреби. Испитивани препарати се могу оставити у контакту са кожом одређено време под одговарајућим покривачем (не-оклузивни, семи-оклузивни или оклузивни) да би се спречила ингестија испитиваног препарата. На крају експозиције покривач се уклања и кожа чисти одговарајућим средством за чишћење, покривач и материјал за чишћење се чувају за анализу, а на кожу се наноси нови покривач. Животиње се смештају у појединачне метаболичке кавезе и екскрети и издахнути ваздух се скупљају за анализу, пре, током и после периода експозиције. Сакупљање издахнутог ваздуха може да се изостави ако постоји довољно података да је формирање испарљивих радиоактивних метаболита минимално или се уопште не јавља. Свака студија обично укључује неколико група животиња које ће бити изложене испитиваном препарату. Једна група ће бити лишена живота на хуман начин на крају периода експозиције. Потом ће друге групе бити лишене живота на хуман начин у планираним интервалима[2]. На крају периода сакупљања узорака, остатак животиња се лишава живота, сакупља се крв за анализу, уклања се и чува за анализу део коже на коју је испитивана супстанца примењена, а лешеви се анализирају за сваки неизлучени материјал. Узорци се анализирају на одговарајуће начине и одређује се степен перкутане апсорпције[6, 8, 9].

1.4. ОПИС МЕТОДЕ

1.4.1. Избор животињске врсте

Обично се користи пацов, али сојеви без длаке и врсте које имају брзине апсорпције сличније оној код људи могу такође да се користе[3, 6, 7, 8, 9]. Укључују се младе, одрасле и здраве животиње истог пола (обично мушког пола) уобичајених лабораторијских сојева. На почетку студије одступање у телесној маси животиње не треба да буде веће од ± 20% од просечне масе. На пример, мужјаци пацова од 200 g до 250 g, посебно на горњој половини овог распона.

1.4.2. Број и пол животиња

Група од најмање четири животиње истог пола користи се за сваки испитивани препарат и свако планирано време лишавања живота на хуман начин. Свака група животиња ће бити лишена живота на хуман начин после различитих временских интервала, нпр. на крају периода експозиције (обично 6 или 24 сата) и у наредним приликама (нпр. 48 и 72 сата). Ако постоје подаци који показују суштинске разлике у дермалној токсичности између мужјака и женки, користи се осетљивији пол. Ако не постоје такви подаци, може да се користи било који од полова.

1.4.3. Услови смештаја и исхране

Температура у простору за чување експерименталних животиња је 22° C (± 3° C). Релативна влажност је најмање 30% и да не премашује 70% осим за време чишћења простора. Циљна влажност је 50% до 60%. Осветљење је вештачко са периодом светлости од 12 сати и периодом мрака од 12 сати.

За исхрану може да се користи уобичајена храна за експерименталне животиње, која је слободно доступна животињама уз неограничен приступ води за пиће. За време студије, а по могућству и за време аклиматизације, животиње се смештају у појединачне метаболичке кавезе. С обзиром да просипање хране и воде могу да компромитују резултате, вероватноћа за овакве догађаје се минимализује.

1.4.4. Припрема животиња

Животиње се означавају да би могле да се појединачно идентификују и чувају се у кавезима најмање пет дана пре почетка студије да би се аклиматизовале на лабораторијске услове.

После аклиматизације и приближно 24 сата пре дозирања, регион рамена и леђа сваке животиње се ошиша. Пропустљивост оштећене коже је различита од оне код интактне коже и због тога се избегава абразија коже. После шишања и приближно 24 сата пре примене испитиване супстанце на кожу (видети одељак 1.4.7. ове методе), површина коже се обрише ацетоном да би се уклонио себум. Додатно прање сапунима и водом се не препоручује због тога што резидуе сапуна могу да промовишу апсорпцију испитиване супстанце. Површина коже мора да буде довољно велика да обезбеди поуздано израчунавање апсорбоване количине испитиване хемикалије по cm^{2} коже, пожељно је најмање 10 cm^{2}. Ова површина је практична за пацове од 200 g до 250 g ТМ. После припреме животиње се враћају у метаболичке кавезе.

1.4.5. Испитивана супстанца

Испитивана супстанца је ентитет чије се пенетрационе испитују. Идеално, испитивана супстанца је радиоактивно обележена.

1.4.6. Испитивани препарат

Препарат испитиване супстанце (нпр. чиста, разблажена хемикалија или формулисани материјал који садржи испитивану хемикалију која се примењује на кожу) је исти (или реални сурогат) као онај којем ће бити изложени људи или друга циљна врста. Свако одступање од препарата у употреби се оправдава. Када је неопходно, испитивна супстанца се раствара или суспендује у одговарајућем вехикулуму. За вехикулуме који нису вода треба познавати апсопрционе карактеристике и могуће интеракције са испитиваном супстанцом.

1.4.7. Примена на кожу

На кожи се дефинише одређени део површине за апликацију. Позната количина испитиваног препарата се равномерно наноси на то место. Ова количина обично имитира могућу екпозицију код људи, типично 1 mg/cm^2 до 5 mg/cm^2 за чврсте или до 10 $\mu l/cm^2$ за течности. Све друге количине се оправдавају условима очекиване примене, циљевима студије или физичким својствима испитиваног препарата. После апликације, третирано место се штити од лизања. Пример типичне справе дат је на Слици 1. Обично се место примене заштити неоклузивним покривачем (нпр. покривач од пермеабилне најлонске газе). За дужу примену место примене се покрива. У случају испаравања полуиспарљивих испитиваних супстанци, долази до неприхватљивог смањења recovery вредности за испитивану супстанцу (видети одељак 1.4.10. први пасус ове методе), неопходно је да се испарена супстанца ухвати филтером од медицинског угља који покрива справу за примену (видети Слику 1). Важно је да ни једна справа не оштећује кожу, нити да апсорбује, нити да реагује са испитиваним препаратом. Животиње се враћају у појединачне метаболичке кавезе да би се сакупљали екскрети.

1.4.8. Трајање експозиције и узорковање

Трајање експозиције је временски интервал између примене и уклањања прањем испитиваног препарата са коже. Користи се одговарајући период експозиције (обично 6 или 24 сата), што се заснива на очекиваној дужини експозиције код људи. После периода експозиције, животиње се задржавају у метаболичким кавезима све до унапред планираног лишавања живота на хуман начин. Животиње се посматрају у редовним интервалима током студије да би се утврдили знаци токсичних/ абнормалних одговора. На крају периода експозиције, третирана кожа се прегледа да би се проверило да ли постоје видљиви знаци иритације.

Метаболички кавези омогућавају одвојено сакупљање урина и фецеса током студије. Они обезбеђују и сакупљање ^{14}C-угљендиоксида и испарљивих ^{14}C- угљеникових једињења која се анализирају када су произведена у довољној количини (више од 5%). Урин, фецес и течност за хватање (нпр. ^{14}C- угљендиоксида и испарљивих ^{14}C-угљеникових једињења) се појединачно сакупљају од сваке групе у свако време узимања узорака. Ако постоји довољно података да се формира мало или нимало испарљивог, радиоактивног метаболита, могу да се користе отворени кавези.

Екскрети се сакупљају за време периода експозиције и до 24 сата после иницијалног контакта са кожом, а потом свакодневно до краја испитивања. Мада су три интервала сакупљања екскрета обично довољна, предвиђена намена испитиваног препарата или постојећи кинетички подаци могу да укажу на то да је за студију погодније да се укључи додатно време и интервали.

На крају периода експозиције, заштитна направа се уклања са сваке животиње и одвојено задржава за анализу. Третирана кожа свих животиња се пере најмање три пута одговарајућим средством за чишћење користећи погодне убрусе. То се чини пажљиво да би се избегла контаминација других делова тела животиње. Средство за чишћење је део уобичајене хигијенске праксе, нпр. водени раствор сапуна. На крају се кожа суши. Сви убруси и испирци се чувају за анализу. Пре враћања у кавезе, примењује се нов покривач да би се заштитило третирано место код животиња које су предвиђене за касније испитивање.

1.4.9. Поступци лишавања живота на хуман начин

За сваку групу, појединачне животиње се лишавају живота на хуман начин у предвиђено време и крв се сакупља за анализу. Заштитна направа или покривач се уклањају за анализу. Кожа са места апликације и сличног дела недозиране, ошишане коже се уклања од сваке животиње за одвојену анализу. Место примене може да се раздели да би се одвојио stratum corneum од епидермиса како би се добио податак о диспозицији испитиване хемикалије. Одређивање ове расподеле током времена, после периода експозиције указује на судбину испитиване хемикалије у stratum cornerumu. Да би се олакшало раздељивање коже (после завршеног прања коже и лишавања живота на хуман начин), сви заштитни покривачи се укљањају. Кожа места апликације са прстеном околне коже се одваја од пацова и причвршћује иглама за подлогу. Парче адхезивне траке се примењује на површину коже уз благи притисак, а потом се трака уклања заједно са делом stratum corneuma. Затим се примењују нови комади адхезивне траке све док се трака више не лепи за површину коже, када је сав stratum corneum уклоњен. За сваку животињу сви делови адхезивне траке могу да се чувају у једном контејнеру коме је додат ткивни дигестант да би се солубилизовао stratum corneum. Сва потенцијално циљна ткива могу да се уклоне за посебна мерења пре него што се остаци анализирају за апсорбовану лешну дозу. Лешеви појединачних животиња се чувају за анализу. Обично је довољна анализа укупног садржаја. Циљни органи могу да се уклоне за одвојене анализе (ако су на то указале друге студије). Урин који се налази у мокраћној бешици при лишавању живота на хуман начин, додаје се у претходно сакупљен урин. После скупљања екскрета из метаболичких кавеза у време лишавања животиња живота на хуман начин, кавези и уређаји за сакупљање се перу одговарајућим растварачем. Други делови опреме који могу бити контаминирани такође се анализирају.

1.4.10. Анализе

У свим студијама треба постићи одговарајућу recovery вредност (нпр. средњу вредност од 100% ± 10% радиаоктивности). Recovery вредности ван ових се оправдавају. Количина примењене дозе у сваком узорку се ализира одговарајућим валидованим поступцима.

Статистичка разматрања укључују меру варијације за понављања за сваку примену.

2. ПОДАЦИ

Следећа мерења се врше за сваку животињу, за свако време узорковања, за испитану хемикалију и/или метаболите (уз појединачне податке, подаци груписани према времену узорковања приказују се као средње вредности):

– количина удружена са заштитним направама;

– количина која може да се уклони са коже;

– количина у/на кожи која не може да се испере са коже;

– количина у узорцима крви;

– количина у екскретима и издахнутом ваздуху (ако је примењиво);

– количина која остане у лешу или у органима који су уклоњени за одвојену анализу.

Количина испитиване супстанце и/или метаболита у екскретима, издахнутом ваздуху, крви и лешу омогућава одређивање укупне апсорбоване количине у свакој временској инстанци. Може се израчунати и количина испитиване хемикалије која је апсорбована по cm^2 изложене коже за време периода експозиције.

3. ИЗВЕШТАЈ

Извештај о испитивању садржи захтеве предвиђене у протоколу, укључујући оправданост система за испитивање који је коришћен, а садржи и податке о:

1) Испитиваној супстанци:

– подаци за идентификацију (нпр. CAS број ако је доступан, извор, чистоћа (радиохемијска чистоћа), познате нечистоће, број серије);

– физичка својства, физичка и хемијска својства (нпр. pH, испарљивост, растворљивост, стабилност, молекулска маса и log Pow).

2) Испитиваном препарату:

– формулација и оправданост примене;

– детаљи о испитиваном препарату, примењена количина, постигнута концентрација, вехикулум, стабилност и хомогеност.

3) Експерименталним животињама:

– коришћена врста/сој;

– број, старост и пол животиња;

– извор животиња, смештај, исхрана и итд.;

– Индивидуалне телесне масе животиња на почетку теста.

4) Условима испитивања:

– детаљи примене испитиваног препарата (место примене, аналитичке методе, оклузија/неоклузија, запремина, екстракција, детекција);

– детаљи о квалитету хране и воде.

5) Резултатима:

– сви знаци токсичности;

– табеларни подаци о апсорпцији (изражени као брзина, количина или проценат);

– укупни recovery у експерименту;

– тумачење резултата, поређење са расположивим резултатима перкутане апсорпције испитиваног једињења.

6) Образложењу резултата.

7) Закључцима.

4. ЛИТЕРАТУРА

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 R.P. (1989) Skin Penetration Method suggested for Environmental Protection Agency Requirements. J. Am. Coll. Toxicol. 8(5), p. 829-835.

5. Kemppainen, B.W., Reifenrath WG (1990) Methods for skin absorption. CRC Press Boca Raton, FL, USA.

6. EPA, (1992) Dermal Exposure Assessment: Principles and Applications. Exposure Assessment Group, Office of Health and Environmental Assessment.

7. EPA, (1998) Health Effects Test Guidelines, OPPTS 870-7600, Dermal Penetration. Office of Prevention, Pedsticides and Toxic Substances.

8. Bronaugh, R.L., Wester, R.C., Bucks, D., Maibach H.I. and Sarason, R., (1990) *In vivo* percutaneous absorption of fragrance ingredients in reshus monkeys and humans. Fd. Chem. Toxic. 28, p. 369-373.

9. Feldman, R.J. and Maibach, H.I., (1970) Absorption of some organic compounds through the skin in man. J. Invest Dermatol. 54, p. 399-404.

Слика 1: Пример дизајна типичне направе која се користи да одреди и заштити место дермалне примене за време *in vivo* студија перкутане апсорпције.

B.45. АПСОРПСИЈА ПРЕКО КОЖЕ: *IN VITRO* МЕТОДА

1. МЕТОДА ИСПИТИВАЊА

Ова метода заснива се на Упутству за испитивање OECD 428 (2004).

1.1. УВОД

Ова метода је намењена да обезбеди податке о апсорпцији испитиване супстанце која је примењена на одсечак коже. Она може да се комбинује са *in vivo* методом за апсорпцију кроз кожу[1] или да се изводи одвојено. Препоручује се да се користи OECD водич за извођење испитивања апсорпције кроз кожу[2] као помоћ у дизајнирању студије засноване на овој методи. Водич је припремљен да олакша избор одговарајућих *in vitro* поступака за коришћење у специфичним околностима, да би се обезбедила поузданост резултата добијених овом методом.

Методе за мерење апсорпције кроз кожу и дермалног транспорта могу да се поделе у две категорије: *in vivo* и *in vitro*. *In vivo* методе могу да обезбеде добар фармакокинетички податак о апсорпцији кроз кожу код различитих врста животиња. *In vivo* метода је описана у посебној методи[1]. *In vitro* методе се годинама користе за мерење апсорпције кроз кожу. Мада формалне валидационе студије *in vitro* метода које се налазе у овој методи испитивања нису изведене, OECD експерти су се сложили 1999 године да постоји довољно евалуираних података који оправдавају *in vitro* методу[3]. Даљи подаци који потврђују ово, укључујући и значајан број поређења *in vivo* и *in vitro* метода наведени су у водичу[2]. Постоје бројне монографије које разматрају ову тему и обезбеђују детаљну позадину примене *in vitro* методе[4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12]. *In vitro* методе мере дифузију хемикалија у и кроз кожу до резервоара течности и могу да користе неживу кожу за мерење дифузије или свежу, метаболички активну кожу за истовремено мерење дифузије и метаболизма коже. Ове методе су посебно погодне као скрининг за поређење транспорта хемикалија у и кроз кожу из различитих формулација и могу да обезбеде корисне моделе за процену перкутане апсорпције код људи.

In vitro метода није примењива у свим ситуацијама и за све класе хемикалија. Могуће је користити *in vitro* методу

испитивања за иницијалну квалитативну евалуацију пенетрације кроз кожу. У одређеним случајевима може бити неопходно да се ово испрати подацима добијеним у *in vivo* испитивањима. Погледати водич[2] за разјашњење ситуација у којима би *in vitro* метода била погодна. Додатни детаљни подаци обезбеђени су у литератури[3].

Ова метода приказује опште принципе за мерење дермалне апсорпције и транспорта испитиване супстанце уз употребу исечка коже. Може да се користи кожа многих врста сисара укључујући и људску. Карактеристика пермеабилности коже се задржава и после исецања зато што је главна дифузиона баријера мртви stratum corneum, а активни транспорт хемикалија кроз кожу није до сада идентификован. За кожу је показано да може да метаболише неке хемикалије током перкутане апсорпције[6], али овај процес није ограничавајући у смислу апсорбоване дозе, мада може да утиче на природу материјала који улази у циркулацију.

1.2. ДЕФИНИЦИЈЕ

Неапсорбована доза јесте доза која је испрана са површине коже после експозиције и део који је присутан на неоклузивном покривачу, укључујући и дозу за коју је показано да је испарила са коже током експозиције.

Апсорбована доза (*in vivo*) јесте количина испитиване супстанце која је доспела у пријемну течност или системску циркулацију током наведеног временског периода.

Апсорбабилна доза јесте доза на или у кожи после испирања.

1.3. ПРИНЦИП МЕТОДЕ

Испитивана супстанца, најбоље радиоактивно обележена, примењује се на површину узорка коже која раздваја две коморе дифузионе ћелије. Хемикалија остаје на кожи одређено време са кожом под одређеним условима, пре уклањања одговарајућим поступком чишћења. Узорци пријемне течности се узимају у одређеним временским инстанцама током експеримента и анализирају се на испитивану хемикалију и/или метаболите.

Када се користе метаболички активни системи, могу да се анализирају метаболити испитиване хемикалије помоћу одговарајућих метода. На крају експеримента квантификује се дистрибуција испитиване хемикалије и њених метаболита када то одговара.

Користећи одговарајуће услове, који су описани у овој методи и у водичу[2], апсорпција испитиване супстанце током датог периода се мери анализом пријемне течности и третиране коже. Испитивана супстанца која остаје у кожи сматра се апсорбованом, осим ако може да се покаже да апсорпција може да се одреди само из вредности у пријемној течности. Анализа других компоненти (материјал испран са коже и онај који је остао у слојевима коже) омогућује даљу евалуацију података, укључујући укупну диспозицију супстанце и recovery у процентима.

Да би показали могућности и поузданост тест система у лабораторији у којој се изводи испитивање, резултати за релевантне референтне хемикалије треба да буду доступни и да буду у складу са подацима датим у литератури за методу која се користи. Овај захтев може да се испуни испитивањем одговарајуће референтне супстанце (пожељно је да липофилност буде блиска липофилности испитиване супстанце), истовремено са испитиваном супстанцом или обезбеђивањем одговарајућих историјских података о већем броју рефернтних супстанци различите липофилности (нрп. кофеин, бензоева киселина и тестостерон).

1.4. ОПИС МЕТОДЕ

1.4.1. Дифузиона ћелија

Дифузиона ћелија се састоји од донорске коморе и пријемне коморе између којих се поставља кожа (пример типичног дизајна је дат на Слици 1). Ћелије треба да обезбеде добро заптивање око коже, омогуће једноставно узорковање и добро мешање пријемног раствора у контакту са доњом страном коже као и добру контролу температуре ћелије и њеног садржаја. Статичне и проточне дифузионе ћелије су једнако прихватљиве.

Обично се донорске ћелије остављају неоклудирана за време експозиције одређеној дози испитиваног препарата. За неодређене апликације и поједина сценарија за одређене дозе, донорске коморе могу да се оклудирају.

1.4.2. Пријемна течност

Препоручује се коришћење физиолошки погодне пријемне течности, мада могу да се користе и друге ако је то оправдано. Наводи се прецизни састав пријемне течности. Показује се одговарајућа растворљивост испитиване хемикалије у пријемној течности тако да течност не представља баријеру за апсорпцију. Уз то, пријемна течност не треба да утиче на интегритет препарата коже. У проточном систему брзина протока не сме да утиче на дифузију испитиване супстанце у пријемну течност. У статичном ћелијском систему, пријемна течност се непрекидно меша и редовно узоркује. Ако се испитује метаболизам, пријемна течност обезбеђује да кожа остане жива током целокупног експеримента.

1.4.3. Препарати коже

Може да се користи кожа људи или животиња. Познато је да је коришћење људске коже предмет домаћих и међународних етичких разматрања и условљавања. Мада је жива кожа боља, нежива кожа може да се користи ако може да се покаже интегритет коже. Прихватљиве су епидермалне мембране (ензимски, топлотно или хемијски одвојене), или одвојени слојеви коже (обично дебљине 200-400 µm) припремљени са дерматомом. Пуна дебљина коже може да се користи али прекомерна дебљина (приближно више од 1 mm) се избегава осим у случају специфичног захтева да се одреди испитивана хемикалија у слојевима коже. Избор врсте, анатомског места и техника припреме се оправдава. Потребни су прихватљиви подаци од најмање четири понављања по испитиваном препарату.

1.4.4. Интегритет препарата коже

Суштинско је да се кожа добро припреми. Неодговарајуће руковање може да има за последицу оштећење stratus corneuma и због тога интегритет припремљене коже се проверава. Када се испитује метаболизам коже, свеж исечак коже се користи што је пре могуће у условима за које се зна да одржавају метаболизам коже. Као опште правило, свеж исечак коже се користи у оквиру 24 сата, али прихватљив период чувања може да варира зависно од ензимског система који је укључен у метаболизам и температуре чувања[13]. Када се препарати коже чувају пре употребе, мора да постоји доказ да је функција баријере очувана.

1.4.5. Испитивана супстанца

Испитивана супстанца је ентитет чије се пенетрационе карактеристике испитују. Идеално, испитивана супстанца је радиоактивно обележена.

1.4.6. Испитивани препарат

Препарат испитиване супстанце (нпр. чиста, разблажена или формулисани материјал који садржи испитивану хемикалију која се примењује на кожу), је једнак (или реална замена) као онај којем ће бити експонирани људи или друга могућа циљна врста. Свака варијација од препарата у употреби се оправдава.

1.4.7. Концентрације испитиване супстанце и формулације

Обично се више од једне концентрације испитиване супстанце користи одражавајући горњу или потенцијалну експозицију људи. Разматра се испитивање различитих типичних формулација.

1.4.8. Примена на кожу

У уобичајеним условима људске експозиције хемикалијама срећу се одређене дозе. Количина која се примењује имитира могућу експозицију код људи, типично 1 mg/cm^2 до 5 mg/cm^2 коже за чврсте или 10 $\mu l/cm^2$ за течности.

Количине се оправдавају очекиваним условима примене, циљевима студије или физичким својствима испитиваног препарата. На пример, примене на површину коже могу бити неодређене у случајевима где се наносе велике запремине по јединици површине.

1.4.9. Температура

На пасивну дифузију хемикалија (и апсорпцију кроз кожу) утиче температура. Дифузиона комора и кожа се одржавају на константној температури која је блиска температури коже од 32° C ± 1° C. Различити дизајн ћелија има различите услове воденог купатила или температурног блока за обезбеђивање одржавања температуре пријемника и коже у физиолошким границама. Влажност је између 30% и 70%.

1.4.10. Трајање експозиције и узорковање

Експозиција коже испитиваном препарату може бити током целокупног експеримента или краћег периода (тј. да би се имитирала специфична врста експозиције људи). Кожа се испере од вишка испитиваног препарата одговарајућим средством за чишћење, а испирак се сакупи за анализу. Поступак уклањања испитиваног препарата зависи од очекиваног услова код примене и оправдава се. Период узорковања од 24 сата је уобичајен да би се обезбедила адекватна карактеризација профила апсорпције. С обзиром да се интегритет коже после 24 сата нарушава, времена узорковања не треба да буду дужа од 24 сата. За испитиване супстанце које продиру у кожу брзо, ово можда није неопходно, али за супстанце које продиру споро може да буде потребно дуже време. Учесталост узимања узорака пријемне течности обезбеђује графичко приказивање апсорпционог профила испитиване супстанце.

1.4.11. Завршни поступци

Сви делови испитиваног система се анализирају и одређује се recovery. Ово укључује донорску комору, испирак површине коже, препарат коже и пријемну течност/комору. У неким случајевима кожа може да се раздвоји на изложени део и део коже испод ћелијског обода и на stratum corneum, епидермис и дермис ради засебних анализа.

1.4.12. Анализа

У свим студијама треба постићи одговарајући recovery (нпр. 100% ± 10% радиоактивности и свако одступање се оправдава). Количина испитиване супстанце у пријемној течности, препарату коже, испицима површине коже и испирак апаратуре се анализирају коришћењем одговарајуће технике.

2. ПОДАЦИ

Наводе се: анализа пријемне течности, дистрибуција испитиване хемикалије у тест систему и апсорпциони профил у времену. Када се користе услови одређене дозе, израчунава се: количина испрана са коже, количина здружена са кожом (и у различитим слојевима коже, ако се анализира) и количина присутна у пријемној течности (брзина, и количина или проценат од примењене дозе). Апсорпција кроз кожу може понекад да се изрази коришћењем података добијених само анализом пријемне течности. Када испитивана супстанца остане у кожи на крају студије, може да буде потребно да се та количина укључи у укупну апсорбовану количину (видети литературу[3]). Када се у експозицији користе услови неодређене дозе, подаци ће омогућити израчунавање константе пермеабилности (у даљем тексту: Kp). Под овим условима, проценат који је апсорбован није релевантан.

3. ИЗВЕШТАЈ

Извештај о испитивању садржи захтеве наведене у протоколу укључујући оправданост система за тестирање који је коришћен, а садржи и податке о:

1) Испитиваној супстанци:

– физичка својства, физичка и хемијска својства (најмање молекулска маса и log Pow), чистоћа (радиохемијска чистоћа);

– подаци о идентификацији (нпр. број серије);

– растворљивост у пријемној течности.

2) Испитиваном препарату:

– формулација и оправданост примене;

– хомогеност.

3) Условима испитивања:

– извори и предео коже, метод припреме, услови чувања пре употребе, претретман (чишћење, третман антибиотицима, итд.), мерења интегритета коже, метаболички статус, оправданост употребе;

– дизајн ћелије, састав пријемне течности, брзина протока пријемне течности или времена узорковања и поступци;

– детаљи примене испитиваног препарата и квантификација примењене дозе;

– трајање експозиције;

– детаљи уклањања испитиваног препарата са коже, тј. испирање коже;

– детаљи анализе коже и техника фракционисања које су коришћене да покажу дистрибуцију у кожи;

– поступци за прање ћелија и опреме;

– методе за анализу, технике екстракције, лимити детекције и валидација аналитичке методе.

4) Резултатима:

– укупан recovery експеримента (примењена доза = испирци коже + кожа + пријемна течност + испирци ћелија);

– табелирање индивидуалних recovery вредности ћелија за сваки компартман;

– апсорпциони профил;

– табелирани подаци о апсорпцији (изражени као брзина, количина или проценат).

5) Образложењу резултата.

6) Закључцима.

4. ЛИТЕРАТУРА

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 B.W. and Reifenrath W.G., (1990) Methods for skin absorption. CRC Press, Boca Raton.

5. Bronaugh R.L. and Collier, S.W., (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 R.L. and Maibach H.I., (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, Lovell 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, J.R. et al. (1996). Methods for assessing Percutaneous absorption. ECVAM Workshop Report ATLA 24, 81 R10.

11. Schaefer, H. and Redelmeier, T.E., (1996). Skin barrier: principles of percutaneous absorption. Karger, Basel. (12)

Roberts, M.S. and Walters, K.A., (1998). Dermal absorption and toxicity assessment. Marcel Dekker, New York.

13. Jewell, C., Heylings, J.R., Clowes, H.M. and Williams, F.M. (2000). Percutaneous absorption and metabolism of dinitrochlorobenzene *in vitro*. Arch Toxicol 74, p. 356-365.

Слика 1: Пример типичног дизајна стичке дифузионе ћелије за *in vitro* студије перкутане апсорпције.

B.46. *IN VITRO* ИРИТАЦИЈА КОЖЕ: ИСПИТИВАЊЕ НА МОДЕЛУ РЕКОНСТРУИСАНОГ ХУМАНОГ ЕПИДЕРМА

Део први

1. МЕТОДА ИСПИТИВАЊА

1.1. УВОД

Иритација коже јесте изазивање реверзибилног оштећења коже након примене испитиване супстанце у трајању до највише 4 сата (према дефиницији датој у Глобално хармонизованом систему за класификацију и обележавање хемикалија (у даљем тексту: ГХС) Уједињених нација (у даљем тексту: УН), у даљем тексту: УН ГХС)[1]. Ова метода испитивања предвиђа *in vitro* поступак који у зависности од захтеваних података омогућава да се иритативно деловање супстанци на кожу одреди независном заменом за испитивање у оквиру стратегије испитивања, у складу са приступом процене квалитета података[2].

Процена иритације коже до сада је углавном захтевала коришћење лабораторијских животиња (видети методу испитивања B.4. која је дата у овом правилнику)[3]. Водећи рачуна о добробити животиња метода испитивања B.4. омогућава да се код одређивања корозивности/иритације коже примени стратегија вишестепеног испитивања и користе валидиране методе *in vitro* и *ex vivo*, како би се избегли бол и патња животиња. За испитивање корозивности у оквиру стратегије вишестепеног испитивања из методе B.4. корисне су три валидиране *in vitro* методе испитивања, односно смернице – B.40. *in vitro* испитивање корозивног оштећења коже: испитивање транскутаног електричног отпора (TER), B.40.bis. *in vitro* корозивно оштећење коже: испитивање на моделу хумане коже и метода OECD: 435[4,5,6].

Ова метода испитивања заснива се на моделима реконструисаног хуманог епидерма који у потпуности (коришћење кератиноцита из хуманог епидерма као извора ћелија, репрезентативног ткива и цитоархитектура) имају веома слична биохемијска и физиолошка својства као горњи делови хумане коже тј. епидерма. Поступак описан у оквиру ове методе испитивања омогућава да се утврди опасност од иритативних супстанци у складу са категоријом 2 УН ГХС.

Ова метода испитивања обухвата и низ референтних стандарда који се користе за процену сличних и модификованих метода испитивања на основу реконструисаног хуманог епидерма[7].

За две *in vitro* методе испитивања[8,9,10,11,12,13,14,15,16,17] у којима се користе модели реконструисаног хуманог епидерма, који су доступни на тржишту као EpiSkin™ и EpiDerm™, завршене су студије предвалидације, оптимизације и валидације. Горе поменута литература заснива се на обележавању R 38. За потребе ГХС обрађени су и одређени аспекти прерачунавања[25]. Методе чије карактеристике одговарају методи испитивања EpiSkin™ (валидирана референтна метода 1) препоручују се као независна замена за испитивање за *in vivo* испитивање на кунићима за потребе класификације иритативних супстанци у категорију 2 ГХС. Методе чије су карактеристике једнаке са методом EpiDerm™ (валидирана референтна метода 2), у односу на класификацију иритативних супстанци у категорију 2 ГХС препоручују се само као скрининг тест или као део стратегије вишестепеног испитивања у оквиру приступа процене квалитета података. Да би се предложено *in vitro* испитивање иритације коже на моделу реконструисаног хуманог епидерма могло користити у сврху спровођења прописа, потребно је одредити његову поузданост, релевантност (тачност) и ограничења у односу на предложени начин коришћења и упоредити га са валидираном референтном методом 1, у складу са стандардима извођења утврђеним у овој методи испитивања (видети Додатак који је дат у овој методи).

Још две *in vitro* методе испитивања на моделу реконструисаног хуманог епидерма валидирана су у складу са захтевима ове методе испитивања и дају сличне резултате као валидирана референтна метода 1[18]. То су модификоване методе испитивања EpiDerm™ (варијанта референтне методе 2) и методе испитивања SkinEthic RHE™ („me-too" метода 1).

1.2. ДЕФИНИЦИЈЕ

Поједини изрази употребљени у овој методи испитивања имају следеће значење:

Тачност јесте степен уједначености између резултата методе испитивања и прихваћених референтних вредности. Она је мерило радних карактеристика методе испитивања и један од аспеката релевантности. Овај термин се често користи у истом значењу као термин „усклађеност” како би се означио удео тачних резултата методе испитивања.

Супстанца за контролу лота јесте референтна супстанца код које ћелије ткива показују средњи степен вијабилности.

Вијабилност ћелија јесте параметар за мерење укупне активности популације ћелија, нпр. способност ћелијских митохондријалних дехидрогеназа да редукују виталну боју МТТ (3 – (4,5 – диметилтиазол-2-ил) – 2,5 – дифенилтетразолијум бромид, тиазолил плаво;), који је, у зависности од ефекта који се мери и поставке испитивања, у корелацији са укупним бројем и/или виталношћу живих ћелија.

ET_{50} јесте време излагања у којем се вијабилност ћелија смањује за 50% након примене маркер супстанце у унапред одређеној фиксној концентрацији, видети такође IC_{50}.

Удео лажно негативних јесте удео свих позитивних супстанци које су методом испитивања погрешно идентификоване као негативне. Она је један од показатеља радних карактеристика методе испитивања.

Удео лажно позитивних јесте удео свих негативних (неактивних) супстанци које су методом испитивања погрешно идентификоване као позитивне. Она је један од показатеља радних карактеристика методе испитивања.

Бесконачна доза јесте количина испитиване супстанце нанесена на кожу која прелази количину која је потребна да се потпуно и равномерно прекрије површина коже.

Глобално хармонизовани систем за класификацију и обележавање хемикалија (у даљем тексту: ГХС) јесте систем који предлаже класификацију хемикалија (супстанци и смеша) према стандардизованим врстама и нивоима физичких опасности и опасности по здравље људи и животну средину, који обухвата и одговарајуће елементе комуникације као што су пиктограми, речи упозорења, обавештења о опасности, обавештења о мерама предострожности и безбедносни листови, да би се пренела информација о њиховим штетним ефектима са циљем да се заштити здравље људи (укључујући послодавце, раднике, превознике, потрошаче и пружаоце помоћи у ванредним ситуацијама) и животна средина[1], а који је транспонован у домаће законодавство правилником којим се уређују класификација, паковање и обележавање хемикалија у складу са Глобално хармонизованим системом за класификацију и обележавање УН.

IC_{50} јесте концентрација при којој маркер супстанца смањује вијабилност ткива за 50% (IC_{50}) након фиксног времена излагања, видети такође ET_{50}.

Стандарди извођења јесу стандарди на основу валидиране референтне методе који чине основу за оцењивање упоредивости предложене методе испитивања која је по механизму и функционално слична провереној референтној методи. Они обухватају: 1) важне елементе методе испитивања, 2) минимални списак референтних супстанци изабраних међу супстанцама које су коришћене за доказивање прихватљивих карактеристика валидиране референтне методе и 3) упоредиве нивое тачности и поузданости које показује предложена метода испитивања код оцењивања применом минималног списка референтних супстанци у односу на валидирану референтну методу.

Поузданост показује у којој мери метода испитивања може поново да се примени унутар једне лабораторије и између више лабораторија у одређеном времену уз примену исте процедуре. Она се оцењује израчунавањем поновљивости унутар једне лабораторије и између више лабораторија.

Осетљивост јесте удео свих позитивних/активних супстанци које су правилно класификоване применом испитивања. То је мера тачности методе испитивања која даје прецизне резултате по категоријама и представља важан фактор за оцену релевантности методе испитивања.

Специфичност јесте удео свих негативних/неактивних супстанци које су правилно класификоване применом испитивања. То је мера тачности методе испитивања која даје прецизне резултате и представља важан фактор за оцену релевантности методе испитивања.

Иритација коже представља настанак реверзибилног оштећења коже након примене испитиване супстанце у трајању до највише 4 сата. Иритација коже је локална неимуногена реакција која се јавља убрзо након стимулације[24]. Њена главна карактеристика је реверзибилан процес који укључује инфламаторне реакције и већину карактеристичних клиничких знакова иритације (еритем, едем, свраб и бол) који се повезују са упалним процесом.

1.3. ПОДРУЧЈЕ ПРИМЕНЕ И ОГРАНИЧЕЊА

Ограничење испитивања са реконструисаним хуманим епидермом у складу са овом методом испитивања састоји се у томе што се помоћу њих супстанце могу класификовати само у категорију 2 иритација коже у оквиру система УН ГХС. Будући да ова испитивања не омогућавају класификацију супстанци у могућу категорију 3 према дефиницији УН ГХС, све остале супстанце ће остати некласификоване (изван категорије). Ова метода испитивања се ревидира у зависности од прописаних захтева и могућег укључивања нових ефеката, побољшања или развоја нових алтернативних „me-too” испитивања.

Ова метода испитивања омогућава да се утврди опасност моноконституентних иритативних супстанци[19], али не пружа одговарајуће информације о иритацији коже. Гасови и аеросоли не могу се испитивати, а смеше још нису процењене у студији валидације.

1.4. ПРИНЦИП ИСПИТИВАЊА

Испитивана супстанца се топикално наноси на тродимензионални модел реконструисаног хуманог епидерма, који чине обични хумани епидермални кератиноцити узгојени ради добијања високо издиференцираног модела хуманог епидерма.

Састоји се од организованих базалних, назубљених и зрнастих слојева и вишеслојног рожнатог слоја (stratum corneum) који садржи међућелијске ламеларне масне слојеве распоређене аналогно обрасцу који се налази *in vivo*.

Принцип испитивања на моделу реконструисаног хуманог епидерма заснива се на претпоставци да иритативне супстанце могу да дифузијом продру у рожнати слој и да су цитотоксичне за ћелије у нижим слојевима. Вијабилност ћелија мери се претварањем виталне боје МТТ [3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолијум бромид, тиазолил плава; EINECS број 206-069-5, CAS број 298-93-1)] у плаву со формазана деловањем дехидрогеназе, која се квантитативно мери након екстракције из ткива[20]. Иритативне супстанце препознају се по томе што снижавају вијабилност ћелија испод дефинисаних прагова (тј. £ 50% за категорију 2 иритативних супстанци УН ГХС). Супстанце које проузрокују вијабилност ћелија изнад дефинисаног прага се не класификују (тј. > 50%, изван категорије).

Системи који се заснивају на моделу реконструисаног хуманог епидерма могу се користити за испитивање чврстих супстанци, течности, получврстих супстанци и воскова. Течности могу бити водене и безводне; чврсте супстанце могу бити растворљиве или нерастворљиве у води. Кад год је могуће чврсте супстанце се испитују у облику ситног праха. Будући да је валидацијом система испитивања на моделу реконструисаног хуманог епидерма обухваћено 58 пажљиво одабраних супстанци које представљају широк спектар хемијских класа, очекује се да ће методе бити опште примењљиве у свим хемијским класама[16]. Валидацијом је обухваћено 13 иритативних супстанци из категорије 2 у складу са ГХС. У валидацију нису укључене киселине које нису корозивне, базе, соли и друге неорганске супстанце као и неке познате класе органских иритативних супстанци, као што су хидропероксиди, феноли и сурфактанти, или су укључени само у ограниченој мери.

1.5. ДОКАЗИВАЊЕ ОСПОСОБЉЕНОСТИ

Пожељно је да лабораторије пре рутинске примене валидираног метода који испуњава захтеве ове методе испитивања докажу техничку оспособљеност на десет препоручених супстанци које су наведене у Табели 1. У оквиру ове методе испитивања, опциона категорија 3 УН ГХС не сматра се категоријом. Да би се нове истоветне („me-too”) методе испитивања развијене из ове методе испитивања, пошто су структурно и функционално сличне валидираним референтним методама, као и модификоване валидиране методе, могле користити у испитивањима за испуњавање прописаних захтева, потребно је доказати упоредиву поузданост и тачност нове методе применом референтних стандарда наведених у Додатку који је дат у Делу другом ове методе.

Табела 1. Супстанце за проверу техничке оспособљености,
које представљају подскуп референтних супстанци
из Додатка који је дат у овој методи

Супстанца	CAS број	Скор *in vivo*	Агрегатно стање	Категорија ГХС
нафтален-сирћетна киселина	86-87-3	0	чврсто	изван кат.
изопропанол	67-63-0	0,3	течно	изван кат.
метил-стеарат	112-61-8	1	чврсто	изван кат.
хептил-бутират	5870-93-9	1,7	течно	Опциона кат. 3
хексил-салицилат	6259-76-3	2	течно	Опциона кат. 3
цикламен-алдехид	103-95-7	2,3	течно	кат. 2
1-бромхексан	111-25-1	2,7	течно	кат. 2
бутил-метакрилат	97-88-1	3	течно	кат. 2
1-метил-3-фенил-1-пиперазин	5271-27-2	3,3	чврсто	кат. 2
хептанал	111-71-7	4	течно	кат. 2

1.6. ОПИС МЕТОДЕ

Дат је опис елемената и поступака у вези са испитивањем на моделу реконструисаног хуманог епидерма за потребе оцењивања иритације коже. Модел реконструисаног хуманог епидерма може се израдити, препарирати или набавити на тржишту (нпр. EpiSkin™, EpiDerm™ и SkinEthic RHE™). Стандардни протоколи испитивања за EpiSkin™, EpiDerm™ и SkinEthic RHE™ могу се преузети са интернета (http://ecvam.jrc.ec.europa.eu[21,22,23]). Испитивање се изводи на следећи начин:

1.6.1. Елементи модела реконструисаног хуманог епидерма

1.6.1.1. Општи услови које испуњава модел

За изградњу епитела користе се нормални типови хуманих кератиноцита. Испод функционалног рожнатог слоја (*stratum corneum*) налазе се вишеструки слојеви виталних епителних ћелија (базални слој, назубљен слој, зрнасти слој). Рожнати слој је вишеслојан и садржи есенцијални профил липида да би произвео чврсту функционалну баријеру способну да заустави брзи продор цитотоксичних маркер супстанци, нпр. натријум додецил сулфат (SDS) или Тритон Х-100. Функција баријере може се оценити одређивањем концентрације маркер супстанце која смањује вијабилност ткива за 50% (IC_{50}) након фиксног времена излагања или одређивањем времена излагања које је потребно да се вијабилности ткива смањи за 50% (ET_{50}) након

примене маркер супстанце у унапред одређеној фиксној концентрацији. Модел мора бити довољно непропустан да спречи пролазак материјала око рожнатог слоја до виталног ткива, јер би то значило лоше моделирање излагања коже. Модел коже не сме бити контаминиран бактеријама, вирусима, микоплазмама или гљивицама.

1.6.1.2. Функционални услови које испуњава модел

1.6.1.2.1. Вијабилност

Пожељна анализа за одређивање степена вијабилности је МТТ испитивање[20]. Оптичка густина (у даљем тексту: OD) екстраховане (растворене) боје из ткива обрађиваног негативном контролом (у даљем тексту: NC) је најмање 20 пута већа од вредности OD самог екстракционог растварача. Потребно је документовати да је ткиво обрађивано негативном контролом стабилно у култури (тј. даје слична мерења вијабилности) за време трајања испитиваног излагања.

1.6.1.2.2. Функција баријере

Рожнати слој и његов састав липида мора бити способан да заустави брзи продор цитотоксичних маркер супстанци, нпр. SDS или Тритон X-100, процењено на основу IC_{50} или ET_{50}.

1.6.1.2.3. Морфологија

Хистолошки преглед реконструисане коже/епидерма врше оспособљена лица, при чему овај преглед доказује да је структура реконструисане коже/епидерма слична структури хумане коже/епидерма (укључујући вишеслојни рожнати слој).

1.6.1.2.4. Поновљивост

Доказује се да су резултати методе код примене одређеног модела поновљиви у времену, по могућности помоћу одговарајуће супстанце за контролу лота (референтне супстанце) (видети Додатак који је дат у овој методи).

1.6.1.2.5. Контроле квалитета (КК) модела

Свака серија модела епидерма испуњава дефинисане критеријуме за одобрење производа, међу којима су најважнији вијабилност (одељак 1.6.1.2.1. ове методе) и функција баријере (одељак 1.6.1.2.2. ове методе). Опсег прихватљивости (горња и доња граница прихватљивости) за IC_{50} односно ET_{50} одређује снабдевач модела коже (или истраживач, ако се користи сопствени модел). Својство баријере ткива проверава лабораторија по пријему ткива. За поуздано предвиђање иритативних ефеката прихватљиви су искључиво резултати добијени са ткивима која испуњавају задате критеријуме. Као пример у даљем тексту наведени су опсези прихватљивости за валидиране референтне методе.

Табела 2. Примери критеријума за одобрење лота у оквиру контроле квалитета

	Доња граница прихватљивости	Средња вредност подручја прихватљивости	Горња граница прихватљивости
Валидирана референтна метода 1 (18-часовна обрада SDS-ом)	IC_{50} = 1,0 mg/ml	IC_{50} = 2,32 mg/ml	IC_{50} = 3,0 mg/ml
Валидирана референтна метода 2 (1% тритон X-100)	ET_{50} = 4,8 hr	ET_{50} = 6,7 hr	ET_{50} = 8,7 hr

1.6.1.3. Примена испитиваних и контролних супстанци

У свакој обради и контролама употребљава се довољан број реплика ткива (најмање три по испитивању). Било да се ради о течностима или о чврстим супстанцама, наноси се довољна количина испитиване супстанце да површина коже буде равномерно прекривена, али пази се да се избегне бесконачна доза (видети одељак 1.2. ове методе), тј. најмање 25 $\mu L/cm^2$ или 25 mg/cm^2. У случају чврстих супстанци површина епидерма се пре наношења навлажи дејонизованом или дестилованом водом како би се обезбедило добро пријањање уз кожу. Кад год је то могуће чврсте супстанце се испитују у облику ситног праха. На крају периода излагања, испитивана супстанца се пажљиво опере са површине коже воденим пуфер раствором или 0,9%-тном NaCl. Зависно од модела реконструисаног хуманог епидерма који се користи, период излагања може бити између 15 и 60 минута, а температура инкубације између 20° C и 37° C.

У свакој студији се паралелно користе негативне контроле (у даљем тексту: NC) и позитивне контроле (у даљем тексту: PC) како би се доказало да се вијабилност (NC), функција баријере и резултујућа осетљивост ткива (PC) крећу у оквирима опсега прихватљивости ранијих испитивања. Предлаже се да се као PC супстанца користи 5%-тни водени раствор SDS. Предложене NC супстанце су вода или раствор соли пуферисан фосфатом (PBS).

1.6.1.4. Мерења вијабилности ћелија

Најважнији елемент поступка испитивања је да се мерења вијабилности не врше непосредно након излагања испитиваној супстанци, већ након довољно дугог периода инкубације након обраде током које се опрана ткива држе у свежем медијуму. Овај период оставља довољно времена да се ткиво опорави од слабих иритативних ефеката, али и да се појаве јасни знакови цитотоксичних ефеката. У фази опитимизације испитивања[9,10,11,12,13] показало се да је оптимални период инкубације након обраде 42 сата и то је коришћено и код валидације референтних метода.

Тест конверзије МТТ је квантитативни валидирани метод за мерење вијабилности ћелија. Тај тест одговара за

тродимензионални модел ткива. Узорак коже се стави у раствор МТТ одговарајуће концентрације (нпр. 0,3 mg/mL – 1 mg/mL) и остави три сата. Наталожени плави формазан се затим екстрахује из ткива помоћу растварача (нпр изопропанол, кисели изопропанол) па се концентрација формазана измери одређивањем вредности OD на 570 nm уз пропусник опсега до највише ± 30 nm.

Оптичка својства испитиване супстанце, односно њено хемијско деловање на МТТ могу ометати анализу и довести до погрешне процене вијабилности (будући да испитивана супстанца може да спречи или окрене процес настајања боје, али и да га изазове). То се може догодити кад се одређена испитивана супстанца не спере у потпуности с коже или продре у епидерм. Ако испитивана супстанца директно делује на МТТ или је природно обојена или се обоји током обраде ткива, употребљавају се додатне контроле како би се утврдио и исправио утицај испитиване супстанце на мерну технику која се користи за мерење вијабилности. Детаљан опис испитивања директне редукције МТТ може се наћи у протоколу испитивања за валидиране референтне методе[21,22,23]. Неспецифична боја (Non-specific colour - NSC) услед тих утицаја не сме да пређе 30% NC (за исправке). Ако је NSC > 30% сматра се да испитивана супстанца није одговарајућа за ову методу.

1.6.1.5. Критеријуми за прихватање испитивања

У сваком истраживању са добрим серијама (видети одељак 1.6.1.2.5. ове методе) вредност OD ткива обрађених негативном контролом указује на квалитет ткива након што су завршени сви кораци испоруке и преузимања и читав поступак у складу с протоколом за испитивање иритације. Вредности OD контрола не смеју бити испод прописаних доњих граница. Исто тако, ткива обрађена позитивном контролом тј. 5%-тним воденим раствором SDS показују задржану осетљивост ткива и способност да реагују на иритативне супстанце у условима сваког појединичног огледа (нпр. вијабилност £ 40% за проверену реферетну методу 1 и £ 20% за валидирану реферетну методу 2). Потребно је дефинисати одговарајуће мере варијабилности између узорака ткива у понављањима (нпр. ако се користе стандардне девијације, оне су £ 18%).

2. ПОДАЦИ И ТУМАЧЕЊЕ РЕЗУЛТАТА

2.1. ПОДАЦИ

Подаци појединачних узорака понављања испитивања у свакој обради (нпр. вредности OD и израчунати проценти вијабилности ћелија за сваку испитивану супстанцу, заједно са класификацијом) приказују се у табеларном облику, укључујући евентуалне податке из поновљених огледа. Осим тога, за сваки оглед се наводе средње вредности ± стандардна девијација. За сваку испитивану супстанцу се наводе запажене интеракције с МТТ реагенсом и обојеним испитиваним супстанцама.

2.2. ТУМАЧЕЊЕ РЕЗУЛТАТА

На основу вредности OD за појединачне испитиване узорке може се израчунати проценат вијабилности у односу на NC, која је одређена као 100%. Потребно је јасно утврдити и документовати преломну вредност процента вијабилности ћелије која се користи за разликовање иритативне супстанце од некласификованих испитиваних супстанци и статистички поступак или поступке који су коришћени за вредновање резултата и идентификацију иритативних супстанци и доказати да су оне одговарајуће. Преломне вредности за предвиђање иритације у вези с валидираним референтним методама:

Сматра се да је испитивана супстанца иритативна за кожу категорија 2 УН ГХС ако је:

1) вијабилност ткива након излагања и инкубације након обраде мања или једнака (≤) 50%.

Сматра се да је испитивана супстанца ван категорије:

2) ако је вијабилност ткива након излагања и инкубације након обраде виша од (>) 50%.

3. ИЗВЕШТАВАЊЕ

3.1. ИЗВЕШТАЈ О ИСПИТИВАЊУ

Извештај о испитивању садржи податке о:

1) Испитиваним и контролним супстанцама:

– хемијски назив, нпр. назив из номенклатуре IUPAC или CAS назив и CAS број, ако су познати;

– чистоћа и састав супстанце (у масеном проценту/тима);

– физичка и хемијска својства важна за спровођење истраживања (нпр. агрегатно стање, стабилност и испарљивост, pH, растворљивост у води, ако су познати);

– обрада испитиваних/контролних супстанци пре испитивања, према потреби (нпр. загревање, уситњавање);

– услови складиштења.

2) Образложењу модела коже и протоколу који је примењен.

3) Условима испитивања:

– ћелијски систем који је употребљен;

– информације о калибрацији мерног уређаја и таласној дужини која је употребљена код мерења вијабилности ћелија (нпр. спектрофотометар);

– потпуне пропратне информације о конкретном кожном моделу који је коришћен, укључујући његове перформансе. То нарочито укључује податке:

(1) вијабилност;

(2) функција баријере;

(3) морфологија;

(4) поновљивост и предвидљивост;

(5) контроле квалитета (КК) модела;

– детаљи поступка испитивања;

– дозе испитивања, трајање излагања и период инкубације након обраде;

– опис могућих измена поступка испитивања;

– упућивање на постојеће податке о моделу; што нарочито укључује:

а) прихватљивост података о контроли квалитета са упућивањем на постојеће податке о серији;

б) прихватљивост вредности позитивних и негативних контрола са упућивањем на средње вредности и опсега за позитивне и негативне контроле,

– опис примењених критеријума вредновања, укључујући образложење одабране(их) граничне(их) вредности модела предвиђања.

4) Резултатима:

– табеларни приказ података за појединачне узорке испитивања,

– опис других уочених ефеката.

5) Образложењу резултата.

6) Закључцима.

4. ЛИТЕРАТУРА

1. United Nations (UN) (2007). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Second revised edition, UN New York and Geneva, 2007. Available at: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev02/02files_e.html.

2. REACH: Guidance on Information Requirements and Chemical Safety Assessment. Available at: http://guidance.echa.europa.eu/docs/guidance_document/information_requirements_en.htm?time=1232447649.

3. Test Method B.4. ACUTE TOXICITY; DERMAL IRRITATION/CORROSION.

4. Test Method B.40. IN VITRO SKIN CORROSION: TRANSCUTANEOUS ELECTRICAL RESISTANCE TEST TER.

5. Test Method B.40 BIS. IN VITRO SKIN CORROSION: HUMAN SKIN MODEL TEST.

6. OECD (2006). Test Guideline 435. OECD Guideline for the Testing of Chemicals. In Vitro Membrane Barrier Test Method. Adopted July 19, 2006. Available at: http://www.oecd.org/document/22/0,2340,en_2649_34377_1916054_1_1_1_1,00.html.

7. ECVAM (2009) Performance Standards for applying human skin models to in vitro skin irritation. Available under Download Study Documents, at: http://ecvam.jrc.ec.europa.eu.

8. Fentem, J.H., Briggs, D., Chesné, C., Elliot, G.R., Harbell, J.W., Heylings, J.R., Portes, P., Roguet, R., van de Sandt, J.J.M. & Botham, P. (2001). A prevalidation study on in vitro tests for acute skin irritation. Results and evaluation by the Management Team. Toxicology in Vitro 15, 57-93.

9. Portes, P., Grandidier, M.H., Cohen, C. & Roguet, R.(2002). Refinement of the EPISKIN protocol for the assessment of acute skin irritation of chemicals: follow-up to the ECVAM prevalidation study. Toxicology in Vitro 16, 765-770.

10. Kandárová, H., Liebsch, M., Genschow, E., Gerner, I., Traue, D., Slawik, B. & Spielmann, H. (2004). Optimisation of the EpiDerm test protocol for the upcoming ECVAM validation study on in vitro skin irritation tests. ALTEX 21, 107-114.

11. Kandárová, H., Liebsch, M., Gerner, I., Schmidt, E., Genschow, E., Traue, D. & Spielmann H. (2005) The EpiDerm Test Protocol fort the Upcoming ECVAM Validation Study on In Vitro Skin Irritation Tests – An Assessment of the Performance of the Optimised Test. ATLA 33, 351-367.

12. Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Portes, P., Roguet, R. & G. Rubinsteen. (2005). The In Vitro Acute Skin Irritation of Chemicals: Optimisation of the EPISKIN Prediction Model within the Framework of the ECVAM Validation Process. ATLA 33, 329-249.

13. Zuang, V., Balls, M., Botham, P.A., Coquette, A., Corsini, E., Curren, R.D., Elliot, G.R., Fentem, J.H., Heylings, J.R.,

Liebsch, M., Medina, J., Roguet, R., van De Sandt, J.J.M., Wiemann, C. & Worth, A.(2002). Follow-up to the ECVAM prevalidation study on in vitro tests for acute skin irritation. ECVAM Skin Irritation Task Force Report 2. ATLA 30,109-129.

14. Spielmann, H., Hoffmann, S., Liebsch, M., Botham, P., Fentem, J., Eskes, C., Roguet, R., Cotović, J., Cole, T., Worth, A., Heylings, J., Jones, P., Robles, C., Kandárová, H., Gamer, A., Remmele, M., Curren, R., Raabe, H., Cockshott, A., Gerner, I. and Zuang, V. (2007) The ECVAM International Validation Study on In Vitro Tests for Acute Skin Irritation: Report on the Validity of the EPISKIN and EpiDerm Assays and on the Skin Integrity Function Test. ATLA 35, 559-601.

15. Hoffmann, S. (2006). ECVAM Skin Irritation Validation Study Phase II: Analysis of the Primary Endpoint MTT and the Secondary Endpoint IL1-α. 135 pp. + annexes. Available under Download Study Documents, at: http://ecvam.jrc.ec.europa.eu.

16. Eskes, C., Cole, T., Hoffmann, S., Worth, A., Cockshott, A., Gerner, I. & Zuang. V (2007) ECVAM International Validation Study on In Vitro Tests for Acute Skin Irritation: Selection of Test Chemicals. ATLA 35, 603-619.

17. J. Cotovio, M.-H. Grandidier, D. Lelièvre, R. Roguet, E. Tinois-Tessonneaud, J. Leclaire (2007). In vitro acute skin irritancy of chemicals using the validated EPISKIN model in a tiered strategy – Results and performances with 184 cosmetic ingredients, AATEX, Special Issue-proceedings from WC6. Vol.14, 351-358.

18. ESAC statement on updated EpiDerm and similar SkinEthic assays. 5 November 2008.

19. EC (2006). Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council of 18 December 2006 concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH), establishing a European Chemicals Agency, amending Directive 1999/45/EC and repealing Council Regulation (EEC) No 793/93 and Commission Regulation (EC) No 1488/94 as well as Council Directive 76/769/EEC and Commission Directives 91/155/EEC, 93/67/EEC, 93/105/EC and 2000/21/EC. Official Journal of the European Union L 396 of 30 December 2006, p. 1. OPOCE, Luxembourg.

20. Mosman, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. Journal of Immunological Methods 65, 55-63.

21. EpiSkin™ SOP, Version 1.6 (January 2005). Validation of the EpiSkin Skin Irritation Test – 42 Hours Assay For The Prediction of Acute Skin Irritation of Chemicals. Available under Download Study Documents, at: http://ecvam.jrc.ec.europa.eu.

22. EpiDerm™ SOP, Version 5.0 (October 2004). Draft Standard Operating Procedure. In Vitro Skin Irritation Test: Human Skin Model. Model: EpiDerm™- 200. Available under Download Study Documents, at: http://ecvam.jrc.ec.europa.eu.

23. SkinEthic RHE™ SOP. Will be available under Download Study Documents, at: http://ecvam.jrc.ec.europa.eu.

24. Harvell, J.D., Lammintausta, K., Maibach H.I. (1995) Irritant contact dermatitis IN: Guin J.D. Practical Contact Dermatitis Mc Graw-Hill New York, pp 7-18

25. Griesinger C, Barroso J & Zuang V: ECVAM background document on the recent adaptations of the ECVAM performance standards for in vitro skin irritation testing in the context of the drafting process of an EU test method and an OECD draft test guideline. Ispra, November 13, 2008.

Део други
ДОДАТАК

Процена карактеристика предложених *in vitro* модела реконструисаног хуманог епидерма за испитивање иритације коже

УВОД

Предложени поступци у оквиру ове методе испитивања се евалуирају како би се одредила њихова поузданост и тачност, користећи супстанце које представљају читав опсег скора иритације према Драјзеу. Код евалуације предложених поступака коришћењем 20 препоручених референтних супстанци (Табела 2. ове методе) добијају се вредности поузданости и тачности које су упоредиве са вредностима валидиране референтне методе 1 (Табела 3. ове методе)[1]. Стандарди тачности и поузданости се испуњавају дати су у тачкама (II) и (III) у даљем тексту. Обухваћене су некласификоване и класификоване супстанце (категорија 2 УН ГХС) које представљају релевантне хемијске класе, тако да се поузданост и карактеристике (осетљивост, специфичност, удео лажно негативних, удео лажно позитивних и тачност) предложене методе испитивања могу упоредити са одговарајућим вредностима валидиране референтне методе 1. Пре него што се метода испитивања употреби за испитивање нових супстанци одређује се њена поузданост као и способност да тачно идентификује иритативне супстанце категорије 2 УН ГХС.

СТАНДАРДИ ИЗВОЂЕЊА

Стандарди извођења обухватају три елемента: I) битне елементе методе испитивања, II) референтне супстанце и III) дефинисане вредности тачности и поузданости[2]. Ови референтни стандарди заснивају се на стандардима извођења који су дефинисани по завршетку валидационе студије иритације коже Европског центра за валидацију алтернативних метода (ECVAM)[3].

I. Битни елементи методе испитивања

Општи услови које испуњава модел

За изградњу епитела користи се нормалан тип хуманих кератиноцита. Испод функционалног рожнатог слоја (*stratum corneum*) налазе се вишеструки слојеви виталних епителних ћелија (базални слој, назубљен слој, зрнасти слој). Рожнати слој је вишеслојан и садржи есенцијални профил липида да би произвео чврсту функционалну баријеру способну да заустави брзи продор цитотоксичних маркер супстанци, нпр. SDS или Тритон Х-100. Функција баријере може се оценити одређивањем концентрације маркер супстанце која смањује вијабилност ткива за 50% (IC_{50}) након фиксног времена излагања или одређивањем времена излагања које је потребно да се вијабилности ткива смањи за 50% (ET_{50}) након примене маркер супстанце у унапред одређеној фиксној концентрацији. Модел мора бити довољно непропустан да спречи пролазак материјала око рожнатог слоја до виталног ткива, јер би то значило лоше моделирање излагања коже. Модел коже не сме да буде контаминиран бактеријама, вирусима, микоплазмама или гљивицама.

Функционални услови које испуњава модел

Вијабилност

Пожељна анализа за одређивање степена вијабилности је МТТ тест[4]. OD екстраховане (растворене) боје из ткива обрађиваног негативном контролом (NC) је најмање 20 пута већа од вредности OD самог екстракционог растварача. Потребно је документовати да је ткиво обрађивано негативном контролом стабилно у култури (тј. даје слична мерења вијабилности) за време трајања испитног излагања.

Функција баријере

Рожнати слој и његов састав липида мора бити способан да заустави брзи продор цитотоксичних маркер супстанци, нпр SDS или Тритон Х-100, процењено на основу IC_{50} или ET_{50}.

Морфологија

Хистолошки преглед реконструисане коже/епидерма врши одговарајуће оспособљено особље, при чему доказује да је њена структура слична структури хумане коже/епидерма (укључујући вишеслојни рожнати слој).

Поновљивост

Доказује се да су резултати метода код примене одређеног модела репродуцибилни у времену, по могућству помоћу одговарајуће супстанце за контролу шарже (референтне супстанце) (видети дефиниције дате у одељку 1.2. ове методе).

Контроле квалитета (КК) модела

Свака серија модела епидерма испуњава дефинисане критеријуме за одобрење производа, међу којима су најважнији вијабилност и функција баријере. Опсег прихватљивости (горња и доња граница прихватљивости) за IC_{50} односно ET_{50} одређује снабдевач модела коже (или истраживач, ако се користи сопствени модел). Својство баријере ткива проверава лабораторија по пријему ткива. За поуздано предвиђање иритативних ефеката прихватљиви су искључиво резултати добијени са ткивима која испуњавају задате критеријуме. Као пример, наведени су опсези прихватљивости за валидиране референтне методе.

Табела 1. Примери критеријума за одобрење лота у оквиру контроле квалитета

	Доња граница прихватљивости	Средња вредност подручја прихватљивости	Горња граница прихватљивости
Валидирана референтна метода 1 (18-часовно третирање SDS-ом)	IC_{50} = 1,0 mg/ml	IC_{50} = 2,32 mg/ml	IC_{50} = 3,0 mg/ml
Валидирана референтна метода 2 (1% тритон Х-100)	ET_{50} = 4,8 hr	ET_{50} = 6,7 hr	ET_{50} = 8,7 hr

II. Референтне супстанце

Референтне супстанце користе се да се утврди да ли је поузданост и тачност предложене нове *in vitro* методе испитивања са реконструисаним хуманим епидермом, а за коју је доказано да је структурно и функционално довољно слична валидираној референтној методи, или представља незнатно модификовану варијанту валидиране референтне методе, упоредива са поузданошћу и тачношћу валидиране референтне методе 1[1]. Двадесет референтних супстанци датих у Табели 2. обухватају супстанце из различитих релевантних хемијских класа као и супстанце из категорије 2 УН ГХС. Листа садржи 10 супстанци из категорије 2 УН ГХС, 3 супстанце из опционе категорије 3 УН ГХС и 7 некласификованих супстанци. У оквиру ове методе испитивања, опциона категорија 3. не сматра се категоријом. Ове референтне супстанце представљају минимални број супстанци који се користи код оцењивања тачности и поузданости предложене методе испитивања иритације коже на моделу реконструисаног хуманог епидерма. У случајевима кад супстанца са листе није доступна, могу се користити и друге супстанце за које су доступни одговарајући референтни подаци *in vivo*. Овој листи референтних супстанци по жељи се могу додати још неке супстанце које представљају друге хемијске класе и за које су доступни одговарајући референтни подаци *in vivo*, како

би се додатно евалуирала тачност предложене методе испитивања.

Табела 2. Референтне супстанце за одређивање тачности и поузданости модела реконструисаних хуманих епидерма који се користе
код испитивања иритације коже

Супстанца *	CAS бр.	EINECS бр.	Агрегатно стање	Резултат оцењивања *in vivo*	Кат. ГХС *in vitro*	Кат. ГХС *in vivo*
1-бром-4-хлорбутан	6940-78-9	230-089-3	течно	0	кат. 2	изван кат.
диетил-фталат	84-66-2	201-550-6	течно	0	изван кат.	изван кат.
нафтален-сирћетна киселина	86-87-3	201-705-8	чврсто	0	изван кат.	изван кат.
алил-феноксиацетат	7493-74-5	231-335-2	течно	0,3	изван кат.	изван кат.
изопропанол	67-63-0	200-661-7	течно	0,3	изван кат.	изван кат.
4-метилтиобензалдехид	3446-89-7	222-365-7	течно	1	кат. 2	изван кат.
метил-стеарат	112-61-8	203-990-4	чврсто	1	изван кат.	изван кат.
хептил-бутират	5870-93-9	227-526-5	течно	1,7	изван кат.	опциона кат. 3
хексил-салицилат	6259-76-3	228-408-6	течно	2	изван кат.	опциона кат. 3
три-изобутил-фосфат	126-71-6	204-798-3	течно	2	кат. 2	опциона кат. 3
1-деканол	112-30-1	203-956-9	течно	2,3	кат. 2	кат. 2
цикламен-алдехид	103-95-7	203-161-7	течно	2,3	кат. 2	кат. 2
1-бромхексан	111-25-1	203-850-2	течно	2,7	кат. 2	кат. 2
2-хлорметил-3,5-диметил-4-метоксипиридин-хидрохлорид	86604-75-3	434-680-9	чврсто	2,7	кат. 2	| кат. 2
а-терпинеол	98-55-5	202-680-6	течни	2,7	кат. 2	кат. 2
ди-*n*-пропил-дисулфид	629-19-6	211-079-8	течно	3	изван кат.	кат. 2
бутил-метакрилат	97-88-1	202-615-1	течно	3	кат. 2	кат. 2
бензенетиол, 5-(1,1-диметилетил)-2-метил	7340-90-1	438-520-9	течно	3,3	кат. 2	кат. 2
1-метил-3-фенил-1-пиперазин	5271-27-2	431-180-2	чврсто	3,3	кат. 2	кат. 2
хептанал	111-71-7	203-898-4	течно	4	кат. 2	кат. 2

* Ових 20 референтних супстанци представља репрезентативни избор од 58 супстанци које су првобитно коришћене у валидацији референтне методе 1 (EpiSkin™). Потпун списак испитиваних супстанци и критеријума за њихов избор дат је у литератури[5].

Супстанце наведене у Табели 2. представљају репрезентативни избор од 58 супстанци коришћених у међународној валидацијској студији иритације коже Европског центра за валидацију алтернативних метода (у даљем тексту: ECVAM)[1]. Њихов избор се заснива на следећим критеријумима:

– ове супстанце су доступне на тржишту,

– репрезентативне су за читав опсег скора иритације према Драјзеу (од иритације до јаке иритације),

– имају добро дефинисану хемијску структуру,

– репрезентативне су за поновљивост и предвидљиву способност валидиране методе, како је утврђено у валидационој студији ECVAM,

– репрезентативне су за хемијску функционалност која је коришћена у процесу валидације,

– немају екстремно токсични профил (нпр. карциногено или токсично деловање по репродукцију) и нису повезане са превисоким трошковима одлагања.

III. Дефинисане вредности тачности и поузданости

Радне карактеристике (осетљивост, специфичност, удео лажно негативних, удео лажно позитивних и тачност) предложене методе испитивања су упоредиве са одговарајућим вредностима валидиране референтне методе 1 (Табела 3), тј. осетљивост је једнака или виша (≥) од 80%, специфичност је једнака или виша (≥) од 70% и тачност је једнака или виша (≥) од 75%. Оне се израчунавају на основу свих класификација 20 супстанци добијених у различитим лабораторијама који су учествовале у истраживању. Класификација супстанци у свакој од лабораторија одређује се на основу средње вредности вијабилности из различитих испитивања (најмање три ваљана испитивања).

Табела 3. Карактеристике валидиране референтне методе 1 [XVII]

Метода испитивања	Број супстанци	Осет-љивост	Специ-фичност	Удео лажно нега-тивних	Удео лажно пози-тивних	Тачност
Валидирана референтна метода 1 [1]	58	87,2% [2]	71,1% [3]	12,8%	29,9%	74,7%
Валидирана референтна метода 1 [1]	20	90%	73,3%	10%	26,7%	81,7%

[1] EpiSkin™

[2]На основу 13 иритативних супстанци 2. кат. ГХС.

[3]На основу 45 иритативних супстанци 3. кат. ГХС или хемикалија изван категорија ГХС.

_____

XVII У Табели 3. приказане су радне карактеристике валидиране референтне методе 1 с обзиром на способност тачног идентификовања иритативних супстанци (категорија 2 УН ГХС) и некласификованих супстанци (изван категорије, укључујући опциону категорију 3) за 58 односно 20 референтних супстанци (Табела 2).

Поузданост предложене методе испитивања је упоредива са поузданошћу валидиране референтне методе.

Поновљивост у оквиру лабораторије

Код оцењивања варијабилности у оквиру лабораторије подударност између класификација (категорија 2 / изван категорије) добијених у различитим независним испитивањима 20 референтних супстанци у истој лабораторији мора бити ³ 90%.

Поновљивост између лабораторија

Процена поновљивости између лабораторија није потребна ако се предложена метода испитивања користи само у једној лабораторији. Ако се метода користи у више лабораторија, подударност између класификација (категорија 2 / изван категорије) добијених у различитим независним испитивањима 20 референтних супстанци, по могућству у најмање три лабораторије, износи ≥ 80%.

ЛИТЕРАТУРА

1. Spielmann, H., Hoffmann, S., Liebsch, M., Botham, P., Fentem, J., Eskes, C., Roguet, R., Cotović, J., Cole, T., Worth, A., Heylings, J., Jones, P., Robles, C., Kandárová, H., Gamer, A., Remmele, M., Curren, R., Raabe, H., Cockshott, A., Gerner, I. and Zuang, V. (2007) The ECVAM International Validation Study on In Vitro Tests for Acute Skin Irritation: Report on the Validity of the EPISKIN and EpiDerm Assays and on the Skin Integrity Function Test. ATLA 35, 559-601.

2. OECD (2005) Guidance Document No. 34 on the validation and international acceptance of new or updated test methods

for hazard assessment. OECD, Paris.

3. ECVAM (2007) Performance Standards for applying human skin models to in vitro skin irritation. Available under Download Study Documents, at http://ecvam.jrc.ec.europa.eu. Accessed on 27.10.2008.

4. Mosman, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. Journal of Immunological Methods 65, 55-63.

5. Eskes, C., Cole, T., Hoffmann, S., Worth, A., Cockshott, A., Gerner, I. & Zuang. V (2007) ECVAM International Validation Study on In Vitro Tests for Acute Skin Irritation: Selection of Test Chemicals. ATLA 35, 603-619.

B.47. МЕТОДА ИСПИТИВАЊА ЗАМУЋЕЊА И ПРОПУСТЉИВОСТИ РОЖЊАЧЕ ГОВЕЧЕТА РАДИ ИДЕНТИФИКОВАЊА ХЕМИКАЛИЈА КОЈЕ ИЗАЗИВАЈУ ТЕШКО ОШТЕЋЕЊЕ И ЈАКУ ИРИТАЦИЈУ ОКА

Део први

1. МЕТОДА ИСПИТИВАЊА

1.1. УВОД

Метода испитивања замућења и пропустљивости рожњаче говечета (Bovine Corneal Opacity and Permeability, у даљем тексту: BCOP) јесте метода испитивања *in vitro* који се под одређеним условима и уз одређена ограничења може користити за класификацију супстанци и смеша као оних које изазивају тешко оштећење и јаку иритацију ока[1,2,3]. У овој методи испитивања, јако иритативне хемикалије су оне које изазивају оштећења ока, која се код кунића одржавају најмање 21 дан након примене. Иако се не вреднује као потпуна замена за *in vivo* испитивање на оку кунића, BCOP се препоручује за употребу као део стратегије вишестепеног испитивања за регулаторну класификацију и обележавање у оквиру одређене области примене[4,5]. Испитиване супстанце и смеше[6] могу се класификовати као оне које изазивају тешко оштећење ока или оне које су јако иритативне за око, без даљег испитивања на кунићима. Супстанца са негативним резултатом испитивања испитује се на кунићу коришћењем стратегије „корак по корак”, која је дефинисана у Методи B.5. која је дата у овом правилнику.

Сврха ове методе испитивања је да опише поступке који се користе за процену могућих својстава испитиване хемикалије да изазове тешко оштећење или јаку иритацију ока што се мери њеном способношћу да изазове замућење и повећану пропустљивост изоловане рожњаче говечета. Токсични ефекти на рожњачи се мере на основу: 1) смањења преноса светлости (непрозирност, замућење) и 2) повећања пролаза боје натријум флуоресцеина (пропустљивост). Процене замућења и пропустљивости рожњаче након примене испитиване супстанце комбинују се како би се извео скор иритативности *in vitro* (Скор иритације у *in vitro* условима, IVIS) који се користи за класификацију према степену иритативности испитивана супстанца.

BCOP методом испитане су и иритативне супстанце за око које изазивају оштећења која нестају за мање од 21 дана, и неиритативне супстанце. Међутим, тачност и поузданост BCOP методе за супстанце које припадају овим категоријама нису формално евалуирани.

1.2. ПОЧЕТНА РАЗМАТРАЊА И ОГРАНИЧЕЊА

Ова метода испитивања заснива се на поступку методе BCOP Међуагенцијског координационог одбора за валидацију алтернативних метода (ICCVAM)[8], који је припремљен након међународне валидационе студије[4,5,9], у којој су учествовали Европски центар за валидацију алтернативних метода (ECVAM) и Јапански центар за валидацију алтернативних метода (JaCVAM). Поступак је заснован на подацима добијеним од Института за истраживања *In Vitro* (IIVS) и Поступка INVITTOX 124[10], који је коришћен у пред-валидационој студији BCOP есеја, спроведеној у периоду од 1997. до 1998. године под покровитељством Европске заједнице. Оба поступка су заснована на методологији испитивања BCOP, о којој су први пут известили Гојтерон и сар.[11].

Ограничења која су препозната за ову методу испитивања заснивају се на великом уделу лажно позитивних резултата за алкохоле и кетоне и великом уделу лажно негативних резултата за хемикалије у чврстом стању запаженим у бази података коришћеној за валидацију (видети одељак 2.2. ове методе)[5]. Ако се супстанце из тих класа једињења и тог агрегатног стања искључе из базе података, тачност BCOP у системима за класификацију супстанци ЕУ, EPA (Environmental Protection Agnecy) и ГХС знатно се побољшава[5]. С обзиром на сврху овог испитивања (тј. да се идентификују само хемикалије које изазивају тешко оштећење ока и оне које су јако иритативне за око), проценат лажно негативних резултата није од кључног значаја, јер се такве супстанце затим испитују на кунићу, или, у зависности од нормативних захтева, са другим одговарајуће валидираним методама *in vitro*, применом стратегије вишестепеног испитивања на основу квалитета података. Садашња база података за валидацију не дозвољава адекватну оцену неких група једињењаили производа (нпр. смеша). Међутим, испитивачи могу да размотре употребу ове методе испитивања за све врсте испитиваних материјала (укључујући смеше), при чему је позитиван резултат прихватљив као показатељ тешког оштећења или јаке иритације ока. Позитивни резултати добијени са алкохолима или кетонима, тумаче се опрезно због ризика од лажно позитивних резултата.

Код свих поступака са говеђим очима и рожњачама придржавати се важећих правила и поступака за објекте у којима се врши испитивање за руковање материјалом животињског порекла, што укључује између осталог, ткива и ткивне течности. Препоручују се опште лабораторијске мере предострожности[12].

Ограничење ове методе испитивања је у томе што иако узима у обзир неке ефекте на оку који су оцењени методом испитивања иритативности на оку кунића, и у извесној мери, њену јачину, не узима у обзир оштећења вежњаче и дужице. Такође, иако се реверзибилност оштећења рожњаче у BCOP не може проценити сама по себи, предложено је, на основу студија на оку кунића, да се оцена почетне дубине оштећења рожњаче може користити за разликовање реверзибилних и

иреверзибилних ефеката[13]. BCOP методом испитивања не може да се процени могућа системска токсичност повезана са излагањем преко ока.

Настоји се да се детаљније окарактеришу корисност и ограничења методе BCOP за идентификацију хемикалија које нису јако иритативне или нису иритативне (видети одељак 2.2. ове методе). Корисници се такође подстичу да дају организацијама за валидацију узорке и/или податке за формалну оцену могућих будућих употреба методе BCOP, укључујући и за идентификовање хемикалија које нису јако иритативне и неиритативних супстанци.

Свака лабораторија која ову методу уводи по први пут, теба да користи хемикалије за проверу способности дате у Додатку 2. ове методе. Лабораторија може да користи ове хемикалије да покаже техничку компетентност у извођењу методе BCOP пре него што достави податке испитивања BCOP ради нормативне класификације опасности.

1.3. ПРИНЦИП МЕТОДЕ

Метода испитивања BCOP је органотипски модел који обезбеђује краткорочно одржавање нормалне физиолошке и биохемијске функције рожњаче говечета у *in vitro* условима. У овој методи, оштећење настало услед излагања испитиваној супстанци процењује се квантитативним мерењима промена у прозирности и пропустљивости рожњаче опацитометром и спектрофотометром у области видљиве светлости. Оба мерења се користе за израчунавање IVIS, који се се користи за додељивање категорије у оквиру класе опасности иритација у *in vitro* условима за предвиђање потенцијала за иритативно деловање испитиване супстанце на око *in vivo* (видети Критеријуме за одлучивање).

У методи испитивања BCOP користе се изоловане рожњаче очију свеже закланих говеда. Замућење рожњаче мери се квантитативно као количина светлости која пролази кроз рожњачу. Пропустљивост се мери квантитативно као количина боје натријум флуоресцеина, која продире кроз целу дебљину рожњаче и детектује се у медијуму у задњој комори. Испитиване супстанце се примењују на епителну површину рожњаче тако што се додају у предњу комору држача рожњаче. Додатак 3. ове методе садржи опис и дијаграм држача рожњаче који се користи за BCOP. Држачи рожњаче могу се набавити на тржишту из различитих извора или их лабораторије могу производити за себе.

1.3.1. Порекло и старост говеђих очију и избор животињске врсте

Говеда у кланицама обично се убијају за људску исхрану или за друге комерцијалне сврхе. Као извор рожњача за испитивање BCOP користе се само здраве животиње погодне за улазак у ланац исхране људи. С обзиром да код говеда постоји широк распон телесне масе, зависно од расе, старости и пола, не постоји препоручена телесна маса за животињу у време клања.

До разлика у величини рожњаче може доћи када се користе очи животиња различите старости. Рожњаче хоризонталног пречника > 30,5 mm и централне дебљине рожњаче (у даљем тексту: CCT) ≥ 1.100 µm обично се добијају од стоке старије од осам година, док се оне са хоризонталним пречником < 28,5 mm и CCT < 900 µm углавном добијају од говеда млађих од пет година[14]. Због тога се обично не користе очи стоке старије од 60 месеци. Очи стоке старости испод 12 месеци такође се обично не користе јер још нису у потпуности развијене, дебљина и пречник рожњаче су знатно мањи него код очију одрасле стоке. Дозвољена је употреба рожњача младих животиња (тј. старости између шест и 12 месеци) јер има предности, као на пример већу доступност, ужи старосни опсег и мањи ризик од евентуалне изложености радника говеђој спонгиформној енцефалопатији[15]. Корисна је даља оцена утицаја величине и дебљине рожњаче на одговор на супстанце које изазивају тешко оштећење или јаку иритацију ока, те се корисници подстичу да наводе процењену старост и/или телесну масу животиња од којих су добијене рожњаче коришћене у студији.

1.3.2. Сакупљање и транспорт очију у лабораторију

Очи сакупља особље кланице. Да би се механичке и друге врсте оштећења свеле на минимум, очи се ваде што је могуће пре после смрти. Да би се спречило излагање очију потенцијалним иритативним супстанцама, особље кланице при испирању глава животиња не сме да користи детергенте.

Очи се потпуно потопе у Ханксов избалансирани раствор соли (у даљем тексту: HBSS) у посуди одговарајуће величине и транспортовати у лабораторију тако да се пропадање и/или контаминација бактеријама сведе на најмању меру. Пошто се очи сакупљају током процеса клања, могу да дођу у контакт са крвљу и другим биолошким материјалом, укључујући бактерије и друге микроорганизме. Зато је важно да се обезбеди да ризик од контаминације буде сведен на минимум (нпр. држањем контејнера са очима на мокром леду, додавањем антибиотика у HBSS који је коришћен за складиштење очију током транспорта (нпр. пеницилин 100 IU/mL и стрептомицин 100 µg/mL)).

Време између сакупљања очију и употребе рожњача у BCOP треба да буде што је могуће краће (обично се сакупе и користе истог дана) и показује се да се не умањује вредност резултата испитивања. Ови резултати су засновани на критеријумима за избор очију, као и одговорима позитивних и негативних контрола. Све очи које се користе у испитивању припадају истој групи очију, сакупљеној одређеног дана.

1.3.3. Критеријуми за избор очију које се користе у BCOP

Када стигну у лабораторију, очи је потребно пажљиво прегледати како би се уочили оштећења укључујући и смањену прозирност, огреботине и неоваскуларизацију. Могу се користити само рожњаче очију без таквих дефеката.

Квалитет сваке рожњаче оцењује се и у каснијим фазама испитивања. Рожњаче са замућењем преко седам јединица (напомена: опацитометер је калибрисан са стандардима замућења који се користе за успостављање јединица замућења, видети Додатак трећи ове методе), после почетног периода од сат времена успостављања равнотеже, одбацују се .

Свака испитивана група (испитивана супстанца, паралелне негативне и позитивне контроле) састоји се од најмање три

ока. Код методе BCOP за негативну контролу употребљавају се три рожњаче. Пошто су све рожњаче исечене из целе очне јабучице и смештене у коморе за рожњаче, постоји могућност да услед утицаја људског фактора при руковању дође до утицаја на појединачне вредности замућења и пропустљивости рожњаче (укључујући и негативне контроле). Вредности замућења и пропустљивости добијене за рожњаче из негативне контролне групе користе се за кориговање вредности замућења и пропустљивости добијене за групе третиране предметом испитивања и групе третиране позитивном контролом у израчунавању IVIS.

1.4. ПОСТУПАК

1.4.1. Припрема ока

Неоштећене рожњаче сецирају се тако да се одржи 2 mm до 3 mm широк руб беоњаче, што олакшава даље руковање, водећи рачуна да се епител и ендотел рожњаче не оштете. Изоловане рожњаче се причвршћују на држаче специјално намењене за то, који се састоје од предњег и задњег одељка, који су, редом, у контакту са епителним и ендотелним странама рожњаче. Обе коморе се до врха испуњавају загрејаним Игловим минималним основним медијумом (у даљем тексту: EMEM) (прво задња комора), водећи рачуна да се не стварају мехурићи. Уређај се потом доводи у равнотежу на 32° C ± 1° C најмање један сат да рожњаче могу да буду уједначене са медијумом и да се постигне нормална метаболичка активност што је више могуће (приближна температура на површини рожњаче *in vivo* је 32° C).

Након периода успостављања равнотеже у обе коморе додаје се свеж, претходно загрејан медијум EMEM и очитава се базна линија замућења за сваку рожњачу. Рожњаче са макроскопским оштећењем ткива (на пример, огреботине, пигментација, неоваскуларизација) или са замућењем од више од седам јединица замућења се одбацују. Израчунава се просечно замућење свих рожњача у равнотежи. За негативну (или растварач) контролу бирају се најмање три рожњаче са вредностима замућења близу средње вредности за све рожњаче. Преостале рожњаче се затим распоређују у групу за даље третирање и позитивну контролну групу.

Пошто је топлотни капацитет воде већи него за ваздух, вода обезбеђује стабилније температурне услове за инкубацију. Због тога се препоручује коришћење воденог купатила за одржавање температуре држача рожњаче и његовог садржаја на 32° C ± 1° C. Могу се користити и ваздушни инкубатори, што подразумева мере предострожности да се одржи стабилност температуре (нпр. претходним загревањем држача и медијума).

1.4.2. Примена испитиване супстанце

Користе се два различита поступка третирања – један за течности и сурфактанте (у чврстом или течном стању) и један за хемикалије у чврстом стању који нису сурфактанти.

Течности се испитују неразблажене, док се сурфактанти испитују у концентрацији од 10% w/v у 0,9% раствору натријум хлорида, дестилованој води или неком другом растварачу, за који је доказано да нема штетни ефекте на систем за испитивање. Получврсте хемикалије, креме и воскови се обично испитују као течности. Ако се користе друге концентрације раствора, на одговарајући начин се образлажу. Рожњаче се излажу течностима и сурфактантима 10 минута. Ако је време изложености другачије, даје се одговарајуће научно образложење.

Чврсте хемикалије које нису сурфактанти обично се испитују као 20% раствори или суспензије припремљени у 0,9% раствору натријум хлорида, дестилованој води или неком другом растварачу, за који је доказано да нема штетне ефекте на систем за испитивање. У одређеним околностима и уз научно оправдање, хемикалије у чврстом стању могу се испитивати једноставно непосредним наношењем на површину рожњаче, користећи методу отворене коморе (видети последњи пасус овог одељка). Рожњаче се излажу хемикалијама у чврстом стању четири сата, али као и код течности и сурфактаната, може се користити другачије време излагања, уз научно образложење.

Могу се користити различите методе третирања у зависности од физичких и хемијских својстава хемикалије (тј. хемикалије у чврстом стању, течности, вискозне течности или невискозне). Најважније је обезбедити да испитивана супстанца адекватно покрива епителну површину и да се на адекватан начин уклања током испирања. Метода затворене коморе обично се користи за невискозне до мало вискозне испитиване супстанце, док се метода отворене коморе обично користи за полувискозне и вискозне течне испитиване супстанце и чисте хемикалије у чврстом стању.

Код методе затворене коморе, преко отвора за дозирање на горњој површини предње коморе додаје се толико испитиване супстанце (750 µL) да прекрије епителну страну рожњаче, а отвори се затим за време излагања печате са заптивним чеповима. Неопходно је да се обезбеди да свака рожњаче буде довољно дуго изложена испитиваној супстанци.

Код методе отворене коморе, пре третмана, са предње коморе се уклања прстен за заптивање прозора и стакло прозора. Контролна или испитивана супстанца (750 µL, или довољно испитиване супстанце да потпуно прекрије рожњаче) наноси се директно на епителну површину рожњача користећи микропипете. Ако се испитивана супстанца тешко пипетира, она се може нанети под притиском у пипету са клипним наставком ради лакше примене дозе. Наставак ове пипете ставља се у врх шприца тако да хемикалија може напунити клипни наставак под притиском. Док се клип шприца полако потискује, клип пипете се повлачи на горе. Ако се у наставку пипете појаве мехурићи ваздуха, предмет испитивања се уклања (избацује) и поступак се понавља све док се наставак не напуни без мехурића. Ако је потребно, може се користити обични шприц (без игле), који омогућава мерење тачне запремине испитиване супстанце и лакше наношење на епителну површину рожњаче. Након примене дозе, на предњу комору се поново намести стакло прозора и поново се успоставља затворени систем.

1.4.3. Инкубација после излагања

Након периода излагања испитивана супстанца, супстанца за негативну контролу или супстанца за позитивну контролу уклањају се из предње коморе, а епител се испира најмање три пута (или док се испитивана супстанца више не види) са

ЕМЕМ (који садржи фенол црвено). За испирање се користи медијум који садржи фенол црвено, јер се промена боје фенол црвеног може пратити да се утврди да ли је испирање киселих или алкалних хемикалија било делотворно. Ако је фенол црвено још увек промењене боје (жута или љубичаста) или ако је испитивана супстанца и даље видљива, рожњаче се испирају више од три пута. Када у медијуму више нема испитиване супстанце, рожњаче се коначно испирају са ЕМЕМ (без фенол црвеног). ЕМЕМ (без фенол црвеног) се користи за коначно испирање да се осигура уклањање фенол црвеног из предње коморе пре мерења замућења. Затим се предња комора напуни свежим ЕМЕМ без фенол црвеног.

За течности или сурфактанте, рожњаче се након испирања инкубирају још два сата на 32° C ± 1° C. У одређеним околностима, корисна је дужа инкубација након излагања, али то зависи од сваког појединачног случаја. Рожњаче на којима се испитују чврсте супстанце, после четири сата излагања се темељно испирају, али не захтевају даљу инкубацију.

На крају периода инкубације након излагања за течности и сурфактанте и након завршетка четири сата излагања за чврсте супстанце које нису сурфактанти, бележе се замућење и пропустљивост сваке рожњаче. Осим тога, свака рожњача се визуелно прегледа и евидентирају се сва битна запажања (на пример: љуштење ткива, присуство остатака испитиване супстанце, неуједначена замућења). Ова запажања могу бити важна, јер могу да се одразе на варијације у очитавању опацитометром.

Контролне супстанце

У сваки експеримент укључује се паралелна негативна контрола или контрола растварача/носача и позитивна контрола.

Код испитивања супстанце у течном стању у концентрацији 100% у методи испитивања BCOP укључује се паралелна негативна контрола (нпр. 0,9 % раствор натријум хлорида или дестилована вода) да се открију неспецифичне промене у систему за испитивање и да се обезбеди базна линија за ефекте који се испитују. Овим се осигурава и да услови испитивања не проузрокују иритативне реакције.

Код испитивања разблажене течности, сурфактанта или хемикалије у чврстом стању у методи BCOP укључује се паралелна контролна група растварача/носача ради откривања неспецифичних промена у систему за испитивање и како би се обезбедила базна линија за посматране ефекте. Може се користити само растварач/носач за који је доказано да нема штетне ефекте на систем за испитивање.

У сваки експеримент укључен је познати иританс за око као паралелна позитивна контрола како би се проверило да ли је изазван одговарајући одговор. Пошто се метода BCOP користи за идентификовање супстанци које доводе до тешког оштећења или јаке иритације ока, у идеалном смислу позитивна контрола је референтна супстанца која у овој методи испитивања изазива јак одговор. Да би се обезбедила могућност оцењивања варијабилности одговора позитивне контроле током времена, степен иритације не треба да буде превелик.

Примери позитивних контрола за испитиване супстанце у течном стању су диметилформамид или 1% натријум хидроксид. Пример позитивне контроле за испитиване супстанце у чврстом стању је 20% (w/v) имидазола у 0,9% раствору натријум хлорида.

Референтне супстанце су погодне за оцену потенцијала за изазивање иритације ока непознате хемикалије специфичне хемијске или производне класе класе једињења или производа, или за оцену релативног иритативног потенцијала иританса за око у одређеном распону иритативних одговора.

1.4.4. Мерење ефеката

Замућење је одређено количином светлости која продире кроз рожњачу. Замућење рожњаче квантитативно се мери помоћу опацитометра, тако да се вредности замућења мере на континуираној скали.

Пропустљивост се одређује количином боје натријум флуоресцеина која продире кроз све слојеве ћелија рожњаче (тј. од епитела на спољашњој површини рожњаче до ендотела на унутрашњој површини рожњаче). У предњу комору држача рожњаче која се граничи са епителном страном рожњаче додаје се 1 ml раствора натријум флуоресцеина (4 mg/ml или 5 mg/ml код испитивања течности и сурфактаната, односно супстанци у чврстом стању које нису сурфактанти), док се задња комора ка ендотелној страни рожњаче, испуњава свежим ЕМЕМ. Држач се затим инкубира у водоравном положају 90 минута ± 5 минута на 32° C ± 1° C. Количина натријум флуоресцеина која пређе у задњу комору се квантитативно мери помоћу UV/VIS спектрофотометрије. Спектрофотометријска мерења на 490 nm бележе се као вредности оптичке густине (у даљем тексту: OD490) или апсорбанције, које се мере на континуираној скали. Вредности пропустљивости флуоросцеина се одређују помоћу вредности OD490 које су измерене спектрофотометром у области видљиве светлости при стандардној дужини пута од 1 cm.

Уместо спектрофотометра може се користити и читач микротитарских плоча са 96-места, ако: 1) се може утврдити линеарни опсег читача за одређивање вредности OD490 флуоресцеина и 2) ако се у микротитарским плочама са 96-места користе тачне запремине флуоресцина које обезбеђују да вредности OD490 одговарају оним добијеним на стандардним дужинама пута од 1 cm (за ово би можда био потребан потпуно пун базенчић (обично 360 mL)).

2. ПОДАЦИ И ИЗВЕШТАВАЊЕ

2.1. Оцењивање података

После кориговања вредности замућења и средње вредности пропустљивости (OD490) за позадинске вредности замућења и вредности пропустљивости негативне контроле OD490, средње вредности замућења и пропустљивости OD490 за сваку

испитивану групу састављају се у емпиријски изведену формулу којом се израчунава скор иритације у *in vitro* условима (IVIS) за сваку испитивану групу, на следећи начин:

IVIS = средња вредност замућења + (15 × средња вредност пропустљивости OD490)

По Сини и сарадницима[16] ова формула је изведена на основу лабораторијских и међулабораторијских студија. Подаци прикупљени током студије за 36 једињења изведене у више лабораторија, подвргнути су мултиваријантној анализи како би се одредила најприкладнија формула за поређење података *in vivo* и *in vitro*. Анализу су извршили истраживачи из две различите компаније и извели готово идентичне једначине.

Вредности замућења и пропустљивости оцењују се независно да се утврди да ли је испитивана супстанца изазива тешко оштећење или јаку иритацију кроз само један од два ефекта (видети Критеријуме за одлучивање).

2.2. Критеријуми за одлучивање

Супстанца која показује IVIS ≥ 55,1 дефинише се као она која изазива тешко оштећење ока или као јако иритативна. Као што је наведено у Уводу ове методе, ако испитивана супстанца није одређена као она која изазива тешко оштећење ока или јако иритативна за око, врши се додатно испитивање ради класификације и обележавања. У поређењу са подацима методе испитивања *in vivo* на оку кунића, класификованим по системима класификације ЕРА[1], ЕУ[2] или ГХС[3], укупна тачност методе испитивања ВСОР је 79% (113/143) до 81% (119/147), удео лажно позитивних резултата, 19% (20/103) до 21% (22/103), а проценат лажно негативних резултата 16% (7/43) до 25% (10/40). Ако се из базе података искључе супстанце одређених класа једињења (нпр. алкохол, кетони) или агрегатног стања, тачност испитивања ВСОР у системима класификације ЕУ, ЕРА и ГХС се креће од 87% (72/83) до 92 одсто (78/85), удео лажно позитивних резултата, 12% (7/58) до 16% (9/56), а проценат лажно негативних резултата од 0% (0/27) до 12% (3/26).

Чак и ако за хемикалије које изазивају тешко оштећење ока и јако иритативне супстанце за око није добијена класификација, здруживањем података добијених у ВСОР и испитивању *in vivo* на оку кунића или одговарајуће валидираним *in vitro* испитивањем, може бити корисно за даљу оцену корисности и ограничења методе испитивања ВСОР за идентификацију супстанци које нису јако иритативне и које нису иритативне (у припреми су смернице за употребу метода испитивања за *in vitro* испитивање токсичности за око).

2.3. Критеријуми за прихватљивост студије

Испитивање се сматра прихватљивим ако се вредност IVIS позитивне контроле креће у оквиру две стандардне девијације од просечне вредности ранијих испитивања која се тренутно користи и која се ажурира најмање једном у три месеца или кад год испитивање врше лабораторије које испитивања врше ретко (тј. мање од једном месечно). Одговори негативне контроле или контроле растварача/носача дају вредности замућења и пропустљивости које су ниже од утврђених горњих граница позадинских вредности за замућење и пропустљивости рожњача говеда третираних са негативним контролама или контролама са растварачем/носачем.

3. ИЗВЕШТАЈ О ИСПИТИВАЊУ

Извештај о испитивању садржи податке о (ако су релевантни за спровођење студије):

1) Испитиваним и контролним супстанцама:

– хемијски назив и то CAS назив и остали називи ако су познати;

– регистарски број (RN) CAS, ако је познат;

– чистоћа и састав супстанци или смеша (у масеним процентима), ако је таква информација доступна;

– физичко-хемијска својства релевантна за спровођење студије, нпр. агрегатно стање, испарљивост, pH вредност, стабилност, класа једињења, растворљивост у води;

– обрада испитиваних/контролних супстанци пре испитивања, ако је потребно (нпр. загревање, уситњавање);

– стабилности, уколико је позната.

2) Спонзору и испитиваној лабораторији:

– име и адреса спонзора, испитиване лабораторије и руководиоца испитивања;

– подаци о извору очију (тј. објекат из којег су узети);

– услови складиштења и транспорта очију (тј. дан и време сакупљања очију, временски период пре почетка испитивања, тренспортни медијум и температурни услови, евентуална употреба антибиотика);

– специфичне карактеристике животиња од којих су узете очи, ако је познато (нпр. старост, пол, телесна маса животиње даваоца).

3) Оправданости методе испитивања и поступци који су коришћени:

– интегритет методе испитивања

– поступак да се обезбеди интегритет (тј. тачност и поузданост) методе испитивања током времена (нпр. периодична испитивања референтних супстанци за проверу способности, коришћење података негативне и позитивне контроле из

ранијих испитивања).

4) Критеријумима за прихватање испитивања:

– прихватљиви опсези за паралелне позитивне и негативне контроле на основу података из ранијих испитивања;

– прихватљиви опсези за паралелне референтне контроле на основу података из ранијих испитивања.

5) Условима испитивања:

– опис коришћеног система за испитивање;

– врста употребљеног држача рожњаче;

– подаци о калибрацији уређаја за мерење замућења и пропустљивости (нпр. опацитометра и спектрофотометар);

– подаци о употребљеним говеђим рожњачама, укључујући и изјаве о њиховом квалитету;

– детаљи о коришћеном поступку испитивања;

– концентрације испитиваних супстанци које су примењене;

– опис сваке промене испитиваног поступка;

– позивање на податке из ранијих испитивања модела (тј. негативних и позитивних контрола, супстанци за проверу способности, референтне супстанце);

– опис коришћених критеријума за оцењивање.

6) Резултатима:

– табеларни приказ података за појединачне испитиване узорке (нпр. вредности замућења и OD490 као и израчунате вредности IVIS за испитиване супстанце и позитивне, негативне и референтне контроле (ако су узете у обзир), укључујући и податке за репликате из поновљених експеримената, ако постоје, и средње вредности ± стандардна девијација за сваки експеримент);

– опис других уочених ефеката.

7) Тумачењу резултата.

8) Закључцима.

4. ЛИТЕРАТУРА

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

2. Regulation (EC) No 1272/2008 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on classification, labelling and packaging of substances and mixtures, amending and repealing Directive 67/548/EEC and 1999/45/EC, and amending Regulation (EC) No 1907/2006. OJ L 353, 31.12.2008, p. 1.

3. UN (2007). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Second revised edition, New York & Geneva: United Nations Publications, 2007. Available: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev02/02files_e.html

4. ESAC (2007). Statement on the conclusion of the ICCVAM retrospective study on organotypic in vitro assays as screening tests to identify potential ocular corrosives and severe eye irritants. Available: http://ecvam.jrc.it/index.htm

5. ICCVAM (2007). Test Method Evaluation Report - In Vitro Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No: 07-4517. Available: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm

6. Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council of 18 December 2006 concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH), establishing a European Chemicals Agency, amending Directive 1999/45/EC and repealing Council Regulation (EEC) No 793/93 and Commission Regulation (EC) No 1488/94 as well as Council Directive 76/769/EEC and Commission Directives 91/155/EEC, 93/67/EEC, 93/105/EC and 2000/21/EC. OJ L 396, 30.12.2006, p. 1.

7. OECD (2002). Test Guideline 405. OECD Guideline for Testing of Chemicals. Acute eye irritation/corrosion. Available: http://www.oecd.org/document/40/0,2340,en_2649_34377_37051368_1_1_1_1,00.html

8. ICCVAM (2007). ICCVAM Recommended BCOP Test Method Protocol. In: ICCVAM Test Method Evaluation Report - In Vitro Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No: 07-4517. Available: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm

9. ICCVAM. (2006). Current Status of In Vitro Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method. NIH Publication No: 06-4512. Research Triangle Park: National Toxicology Program. Available: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_ice.htm

10. INVITTOX (1999). Protocol 124: Bovine Corneal Opacity and Permeability Assay – SOP of Microbiological Associates Ltd. Ispra, Italy: European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM).

11. Gautheron, P., Dukic, M., Alix, D. and Sina, J.F. (1992). Bovine corneal opacity and permeability test: An in vitro assay of ocular irritancy. Fundam. Appl. Toxicol. 18:442-449.

12. Siegel, J.D., Rhinehart, E., Jackson, M., Chiarello, L., and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (2007). Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings. Available: http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf.

13. Maurer, J.K., Parker, R.D. and Jester, J.V. (2002). Extent of corneal injury as the mechanistic basis for ocular irritation: key findings and recommendations for the development of alternative assays. Reg. Tox. Pharmacol. 36:106-117.

14. Doughty, M.J., Petrou, S. and Macmillan, H. (1995). Anatomy and morphology of the cornea of bovine eyes from a slaughterhouse. Can. J. Zool. 73:2159-2165.

15. Collee, J. and Bradley, R. (1997). BSE: A decade on - Part I. The Lancet 349: 636-641.

16. Sina, J.F., Galer, D.M., Sussman, R.S., Gautheron, P.D., Sargent, E.V., Leong, B., Shah, P.V., Curren, R.D., and Miller, K. (1995). A collaborative evaluation of seven alternatives to the Draize eye irritation test using pharmaceutical intermediates. Fundam Appl Toxicol 26:20-31.

17. ICCVAM (2006). Background review document, Current Status of In Vitro Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) Test Method. Available:http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm

18. ICCVAM (2006). Background review document, Current Status of In Vitro Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Isolated Chicken Eye (ICE) Test Method. Available:http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm

Део други

ДОДАТАК 1.

ДЕФИНИЦИЈЕ

Тачност јесте степен уједначености између резултата испитивања и прихваћених референтних вредности. Она је мерило карактеристика методе испитивања и један од аспеката релевантности. Често се користи у истом значењу као „усклађеност" како би се означио удео тачних резултата методе испитивања.

Референтна супстанца јесте супстанца која се користи као стандард за поређење са испитиваном супстанцом. Референтна супстанца има следећа својства: 1) сталан и поуздан извор; 2) структурну и функционалну сличност са класом једињења које се испитује; 3) позната физичка/хемијска својства; 4) податке о познатим ефектима и 5) познати потенцијал у опсегу очекиваног одговора.

Рожњача јесте прозирни део предњег дела очне јабучице који покрива вежњачу и дужицу и пропушта светлост у унутрашњост.

Замућење рожњаче јесте мера обима замучености рожњаче након излагања испитиваној супстанци. Повећано замућење рожњаче указује на оштећење рожњаче. Замућење се може евалуирати субјективно као код Драјзеове методе на оку кунића или објективно помоћу инструмента као што је опацитометар.Пропустљивост рожњаче јесте квантитативна мера оштећења епитела рожњаче одређивањем количине боје натријум флуоресцеина која пролази кроз све слојеве ћелија рожњаче.

ЕРА категорија 1 јесте корозивно (иреверзибилно уништавање ткива ока) које оштећује рожњачу или изазива иритацију која се одржава више од 21 дан[1].

ЕУ категорија R41 јесте оштећење ткива ока, или озбиљно физичко пропадање вида, након наношења испитиване супстанце на предњу површину ока, која није у потпуности реверзибилна у року од 21 дана од примене[2].

Удео лажно негативних јесте удео свих позитивних супстанци које су методом испитивања погрешно идентификоване као негативне. Један је од показатеља карактеристика методе испитивања.

Удео лажно позитивних јесте удео свих негативних супстанци које су методом испитивања погрешно идентификоване као позитивне. Један је од показатеља карактеристика методе испитивања.

ГХС јесте Глобално хармонизовани систем за класификацију и обележавање хемикалија, односно систем који предлаже класификацију хемикалија (супстанци и смеша) према стандардизованим врстама и нивоима физичких опасности и опасности по здравље људи и животну средину, који обухвата и одговарајуће елементе комуникације, као што су: пиктограми, знакови опасности, писана упозорења, ознаке ризика и безбедности и безбедносни листови, да би се пренела информација о њиховим штетним ефектима са циљем да се заштите људи (укључујући послодавце, раднике, превознике, потрошаче и пружаоце помоћи у ванредним ситуацијама) и животна средина[3].

ГХС категорија 1 јесте оштећење ткива ока, или озбиљно физичко пропадање вида, након наношења испитиване супстанце на предњу површину ока, која није потпуно реверзибилна у року од 21 дана од примене[3].

Опасност јесте својство агенса или ситуације које може да доведе до штетних ефеката када су организам, систем или (суб)популација изложени том агенсу.

Скор иритатације у *in vitro* условима (*In Vitro* Irritancy Score, IVIS) јесте вредност која се рачуна према емпиријски изведеној формули која се користи у методи ВСОР помоћу које се средње вредности замућења и пропустљивости за сваку испитивану групу комбинују у један јединствени скор *in vitro* за сваку третирану групу. IVIS = средња вредност замућења + (15 × средња вредност пропустљивости).

Негативна контрола јесте нетретирани узорак који садржи све компоненте система за испитивање. Овај узорак се обрађује са узорцима третираним испитиваном супстанцом и другим контролним узорцима да утврди има ли интеракције између растварачаи система за испитивање.

Хемикалија која није иритативна јесу супстанце које нису класификоване као супстанце иритативне за око ЕРА категорије 1, 2, или 3; ЕУ категорије R41 или R36 или ГХС категорије 1, 2А или 2Б.

Хемикалија која изазива тешко оштећење ока јесте: а) супстанца која изазива иреверзибилно оштећење ткива ока; б) супстанце које су класификоване као иритативне за око ГХС категорије 1, ЕРА категорије 1, или ЕУ категорије R41[1,2,3].

Иритативно за око јесте: а) супстанца која доводи до реверзибилне промене у оку након наношења на предњу површину ока; б) супстанце које су класификоване као супстанце иритативне за око ЕРА категорије 2 или 3 ЕУ категорије R36 или ГХС категорије 2А или 2Б [1,2,3].

Јако иритативно за око јесте: а) супстанца која изазива оштећење ткива ока након наношења на предњу површину ока које се не повлачи у року од 21 дана од дана наношења или изазива озбиљно физичко пропадање вида, б) супстанце које су класификоване као супстанце иритативне за око ГХС категорије 1, ЕРА категорије 1, или ЕУ категорије R41[1,2,3].

Опацитометар јесте инструмент који се користи за мерење замућења рожњачеквантитативном евалуацијом преношења светлости кроз рожњачу. Типичан инструмент има два одељка, сваки са сопственим извором светлости и фотоћелијом. Један одељак се користи за третирану рожњачу, а други се користи за калибрацију и подешавање инструмента на нулту вредност. Светлост из халогене лампе се шаље кроз контролни одељак (празна комора без прозора или течности) у фотоћелију и упоређује са светлошћу која се шаље кроз експериментални одељак, у коме се налази комора са рожњачом, у фотоћелију. Упоређује се разлика у преношењу светлости из фотоћелија и на дигиталном екрану се приказује нумеричка вредност замућења.

Позитивна контрола јесте узорак који садржи све компоненте система за испитивање и који се третира супстанцом за коју се зна да изазива позитивни одговор. Да би се обезбедило да варијабилност у одговору позитивне контроле може да се оцењује током времена, јачина одговора не сме да буде претерана.

Поузданост показује у којој мери метода испитивања може поновљиво да се изводи унутар једне лабораторије и између више лабораторија током времена уз примену истог поступка. Оцењује се израчунавањем поновљивости унутар једне лабораторије и између више лабораторија.

Контрола растварача/носача јесте нетретирани узорак који садржи све компоненте система за испитивање, укључујући растварач или носач који се обрађује са узорцима третираним испитиваном супстанцом и другим контролним узорцима како би се утврдила базна линија одговора за узорке третиране испитиваном супстанцом растворeном у том растварачу или носачу. Када се испитује са паралелном негативном контролом, овај узорак показује и да ли растварач или носач реагује са системом за испитивање.

Вишестепено испитивање јесте стратегија испитивања корак по корак где се одређеним редоследом прегледају све постојеће информације о испитиваној супстанци, при чему се на сваком кораку користи поступак процене квалитета података да би се утврдило да ли постоји довољно информација за одлуку о класификовању супстанце као опасне, пре преласка на следећи степен. Ако се на основу постојећих информација може приписати иритативни потенцијал испитиваној супстанци, није потребно додатно испитивање. Ако се на основу постојећих информација не може приписати иритативни потенцијал испитиване супстанце, изводи се поступак вишестепеног испитивања корак по корак на животињама док не буде могуће извршити недвосмислену класификацију.

Валидирана метода испитивања јесте метода испитивања код које су на основу извршених студија валидације утврђени релевантност (укључујући и тачност) и поузданост за одређену намену. Важно је напоменути да валидирана метода испитивања не мора да има задовољавајуће карактеристике у погледу тачности и поузданости да би била прихватљива за предложену намену.

Квалитет података јесте поступак разматрања предности и слабости различитих информација да се донесе и подржи закључак у погледу потенцијалне опасности супстанце.

ДОДАТАК 2.
СУПСТАНЦЕ ЗА ПРОВЕРУ СПОСОБНОСТИ ЗА ИЗВОЂЕЊЕ МЕТОДЕ ИСПИТИВАЊА ВСОР

Пре рутинског коришћења методе испитивања која испуњава захтеве ове методе испитивања, лабораторије ће можда желети да покажу техничку стручност тако што ће правилно класификовати 10 супстанци препоручених у Табели 1. која је дата у овој методи у погледу њиховог својства да изазивају тешко оштећење ока. Ове супстанце су изабране да представљају опсег одговора за локалну иритацију/тешко оштећење ока, на основу резултата испитивања *in vivo* на оку кунића (TG 405)

(тј. категорије 1, 2А, 2Б, или не испуњавају критеријуме за класификацију и обележене према УН ГХС[3,7]). Међутим, с обзиром да је потврђена корисност ових испитивања (тј. да се идентификују само супстанце које изазивају тешко оштећење/иритацију ока), постоје само два исхода испитивања за сврху класификације (изазивају тешко оштећење ока и јако иритативне за око или не изазивају тешко оштећење ока и нису јако иритативне) која показују оспособљеност. Други критеријуми за избор супстанци били су да се оне могу наћи у промету, да постоје висококвалитетни референтни подаци *in vivo*, а постоје и квалитетни подаци из две методе *in vitro* за које се израђују Смернице за испитивање. Из тог разлога, иритативне супстанце су изабране са препорученог списка ICCVAM од 122 референтне супстанце за валидацију метода испитивања *in vitro* за утврђивање токсичности за око (видети литературу[5]). Референтни подаци се могу наћи у ранијем прегледу методе испитивања BCOP и методе на изолованом оку пилета (у даљем тексту: ICE)[17,18].

Табела 1. Препоручене супстанце за показивање техничке оспособљености за BCOP

Супстанца	CAS бр.	класа једињења[1]	агрегатно стање	Класифи-кација *In Vivo*[2]	Класифи-кација *In Vitro*[3]
бензалконијум хлорид (5%)	8001-54-5	Онијум једињење	Течно	Категорија 1	тешко оштећење ока/јако иритативно за око
хлорхексидин	55-56-1	амин, амидин	чврсто	Категорија 1	корозивна/јако иритативна супстанца
дибензоил-L-винска киселина	2743-38-6	карбоксилна киселина, естар	чврсто	Категорија 1	тешко оштећење ока/јако иритативно за око
имидазол	288-32-4	хетероциклично једињење	чврсто	Категорија 1	тешко оштећење ока/јако иритативно за око
трихлорсирћетна киселина (30%)	76-03-9	карбоксилна киселина	течно	Категорија 1	тешко оштећење ока/јако иритативно за око
2,6-дихлоробензоил хлорид	4659-45-4	ацил-халогенид	течно	Категорија 2А	не изазива тешко оштећење ока/ ни јаку иритацију ока
етил-2-метилацетоацетат	609-14-3	кетон, естар	течно	категорија 2Б	не изазива тешко оштећење ока/ ни јаку иритацију ока
амонијум-нитрат	6484-52-2	неорганска со	чврсто	Категорија 2А	не изазива тешко оштећење ока/ ни јаку иритацију ока
глицерол	56-81-5	алкохол	течно	није класификована	не изазива тешко оштећење ока/ ни јаку иритацију ока
n-хексан	110-54-3	угљоводоник (ациклични)	течно	није класификована	не изазива тешко оштећење ока/ ни јаку иритацију ока

Скраћенице (Chemical Abstracts Service Registry Number, CASRN)

[1] Хемијске класе су додељене свакој испитиваној супстанци користећи стандардну шему класификације, на основу систем класификације медицинског предметног регистра Националне медицинске библиотеке (доступан на http://www.nlm.nih.gov/mesh).

[2] На основу резултата добијених испитивањем *in vivo* на оку кунића (OECD TG 405) и користећи УН ГХС[3,7].

[3] На основу резултата у BCOP и ICE.

ДОДАТАК 3.
ДРЖАЧ РОЖЊАЧЕ ЗА BCOP

Држачи рожњаче за BCOP израђени су од инертног материјала (нпр. полипропилен). Држачи се састоје од две половине (предње и задње коморе) и имају две слична цилиндричне унутрашње коморе. Свака комора има обим од 5 ml и завршава се стакленим прозором, кроз који се бележе вредности замућења. Свака од унутрашњих комора има 1,7 cm у пречнику и дубока је 2,2 cm^1. О-прстен се налази на задњој комори и користи се за спречавање цурења. Рожњаче су постављене ендотелном страном на доле на о-прстен задњих комора, а предње коморе су постављене на епителну страну рожњача. Коморе се одржавају на месту са по три шрафа од нерђајућег материјала који се налазе на спољним ивицама коморе. На крају сваке коморе налази се стаклени прозор који се може уклонити ради лакшег приступа рожњачи. О-прстен се такође налази између стакла прозора и коморе како би се спречило цурење. Две рупе на врху сваке коморе омогућавају уношење и уклањање медијума и испитиваних једињења. Током периода испитивања и инкубације оне су затворене гуменим чеповима.

ОПАЦИТОМЕТАР

Опацитометар јесте уређај за мерење преноса светлости. Светло халогене лампе се шаље кроз контролни одељак (празна комора без прозора или течности) у фотоћелију и упоређује са светлошћу која се шаље кроз експериментални одељак, у коме се налази комора са рожњачом, у фотоћелију. Упоређује се разлика у преношењу светлости из фотоћелија и на дигиталном екрану се приказује нумеричка вредност замућења. Утврђене су јединице замућења.

Опацитометар обезбеђује линеарни одговор кроз низ очитавања замућења који покривају граничне тачке које се користе за различите класификације описане Моделом предвиђања (тј. до граничних тачака за одређивање тешког оштећења и јако иритативног својства). Да би се обезбедила линеарна и прецизна очитавања до 75 односно 80 јединица замућења, неопходно је да се калибрише опацитометер користећи низ калибратора. Калибратори (непрозирни листови од полиестера) се постављају у комору за калибрацију (комора за рожњаче намењена да држи калибраторе) и очитавају на опацитометру. Комора за калибрацију је намењена да држи калибраторе на приближно истом растојању између светлости и фотоћелија као што би рожњаче биле постављене током мерења замућења. Опацитометар се прво калибрише на 0 јединица замућења при чему се користи комора за калибрацију без калибратора. Затим се три различита калибратора стављају један по један у комору за калибрацију и мери се замућење. Калибратори 1, 2 и 3 показују вредности замућења које су једнаке њиховим унапред одређеним вредностима од 75, 150, односно 225 јединица замућења ± 5%.

B.48. МЕТОДА ИСПИТИВАЊА НА ИЗОЛОВАНОМ ОКУ ПИЛЕТА ЗА ИДЕНТИФИКОВАЊЕ ХЕМИКАЛИЈА КОЈЕ ИЗАЗИВАЈУ ТЕШКО ОШТЕЋЕЊЕ ОКА И ЈАКУ ИРИТАЦИЈУ ОКА

Део први

1. МЕТОДА ИСПИТИВАЊА

1.1. УВОД

Метода испитивања на изолованом оку пилета (у даљем тексту: ICE) је *in vitro* метода која се може користити под одређеним условима и уз одређена ограничења, у циљу класификације супстанци и смеша као оних које изазивају тешко оштећење ока и јаку иритацију ока[1,2,3]. У овој методи испитивања јако иритативне супстанце су оне супстанце које изазивају повреде ока које се код заморца задржавају најмање 21 дан након примене. Иако не може у потпуности да замени испитивање *in vivo* на оку заморца ICE се препоручује за употребу као део вишестепене стратегије испитивања за прописану класификацију и обележавање у оквиру посебног подручја примене[4,5]. Испитиване супстанце и смеше[6] које у овом испитивању дају позитиван резултат могу се класификовати као оне које изазивају тешко оштећење ока или су јако иритативне без додатног испитивања на кунићу. Супстанца са негативним резултатом испитивања испитује се на кунићу коришћењем стратегије вишестепеног испитивања, која је дефинисана у методи B.5. која је дата у овом прилогу.

Сврха ове методе испитивања је да се опишу поступци који се користе за оцену потенцијалног својства испитиване супстанце да изазове тешко оштећење или јаку иритацију ока у погледу њене способности да у изолованом оку пилета доведе до појаве токсичног ефекта. Токсични ефекти на рожњачу се мере: 1) квалитативним оцењивањем замућења, 2) квалитативним оцењивањем оштећења епитела на основу наношења флуоресцеина на око (задржавање флуоресцеина), 3) квантитативним мерењем повећане дебљине (надутости) и 4) квалитативним оцењивањем макроскопског морфолошког оштећења површине. Замућење рожњаче, надутост и процене оштећења након излагања испитиваној супстанци оцењују се појединачно, а затим у комбинацији, како би се извела класификација према иритативности за око.

Методом ICE испитиване су и супстанце иритативне за око које изазивају лезије које нестају за мање од 21 дан и супстанце које нису иритативне. Међутим, прецизност и поузданост методе испитивања ICE за супстанце у овим категоријама нису формално оцењене.

1.2. ПОЧЕТНА РАЗМАТРАЊА И ОГРАНИЧЕЊА

Ова метода испитивања заснива се на поступку[8] методе ICE Међуагенцијског координационог одбора за валидацију алтернативних метода (у даљем тексту: ICCVAM), који је сачињен по међународној валидационој студији[4,5,9], у којој су учествовали Европски Центар за валидацију алтернативних метода, Јапански центар за валидацију алтернативних метода и Одељење за токсикологију и примењену фармакологију холандског Института за истраживања квалитета живота (у даљем

тексту: TNO). Поступак се заснива на информацијама добијеним из објављених поступака и садашњег поступка који користи TNO[10,11,12,13,14].

Утврђена ограничења за ову методу испитивања заснивају се на великом уделу лажно позитивних резултата за алкохоле и великом уделу лажно негативних резултата за супстанце у чврстом стању и сурфактанте (видети одељак 2.1. ове методе)[4]. Када се супстанце из ове класе једињења и агрегатног стања искључе из базе података, тачност ICE у системима за класификацију ЕУ, EPA и ГХС се знатно побољшава[4]. С обзиром на сврху ове анализе (тј. да се идентификују само супстанце које изазивају тешко оштећење и јаку иритацију ока), лажно негативни резултати нису од кључног значаја, јер се такве супстанце затим испитују на кунићу, или, у зависности од нормативних захтева, са другим одговарајуће валидираним испитивањима *in vitro*, применом вишестепене стратегије испитивања на основу квалитета података. Осим тога, садашња база података за валидацију није дозвољавала адекватну оцену неких класа једињења или производа (нпр., смеше). Испитивачи могу размотрити коришћење ове методе испитивања за испитивање свих врста материјала (укључујући смеше), при чему се позитиван резултат прихвата као показатељ супстанце која изазива тешко оштећење ока или је јако иритативна за око. Позитивни резултати добијени употребом алкохола опрезно се тумаче због опасности од прецењивања.

Код свих поступака са оком пилета поштују се важећи прописи и процедуре за руковање материјалом хуманог или животињског порекла, у које спадају, између осталог ткива и ткивне течности. Препоручују се универзалне мере предострожности за лабораторије[15].

Ограниченост ове методе испитивања је у томе што иако узима у обзир неке окуларне ефекте који су оцењени методом испитивања за одређивање иритације на оку кунића и у извесној мери њихову озбиљност, не узима у обзир оштећења вежњаче и дужице. Такође, иако се реверзибилност оштећења рожњаче код методе ICE не може проценити сама по себи, предложено је, на основу студије на оку кунића, да се оцени почетна дубина оштећења рожњаче и тако утврди разлика између иреверзибилних и реверзибилних ефеката[16]. Испитиваном методом ICE не може да се процени потенцијална системска токсичност у вези са излагањем преко ока.

Тренутно се предузимају напори да се додатно карактеришу корисност и ограничења методе испитивања ICE за одређивање слабије иритативних и супстанци које нису иритативне (видети одељак 2.1. ове методе). Корисницима се препоручује да обезбеде организацијама за валидацију узорке и/или податке за формалну евалуацију могућих коришћења методе испитивања ICE у будућности, укључујући и за идентификацију слабије иритативних и супстанци које нису иритативне.

Свака лабораторија која ову методу успоставља по први пут, користи хемикалије за проверу способности дате у Додатку 2. ове методе. Лабораторија може да користи ове хемикалије да покаже техничку компетицију за извођење методе ICE пре него што се подаци ICE доставе ради нормативне класификације опасности.

1.3. ПРИНЦИП МЕТОДЕ

Метода испитивања ICE је органотипски модел који обезбеђује краткорочно одржавање ока пилета у условима *in vitro*. Код ове методе испитивања, оштећење које изазива испитивана супстанца процењује се одређивањем надутости рожњаче, замућења и задржавања флуоресцеина. Док последња два параметра укључују квалитативну процену, анализа надутости рожњаче омогућава квантитативну процену. Свако мерење претвара се у квантитативан резултат који се користи за израчунавање укупног индекса иритације или му се додељује квалитативна категорија која се користи за класификацију у класу тешко оштећење ока и јакаиритација ока *in vitro*. Оба резултата се могу користити за предвиђање потенцијала испитиване супстанце да изазове тешко оштећење или јаку иритацију ока *in vivo* (видети Критеријуме за одлучивање).

1.3.1. Извор и старост очију пилића

За ову анализу обично се користе очи пилића који су заклани у кланицама и намењени за исхрану људи, чиме се елиминише потреба за лабораторијским животињама. Користе се само очи здравих животиња погодних за улазак у ланац исхране људи.

Иако није спроведена контролисана студија за процену оптималне старости пилета, у овој методи испитивања користе се млади пилићи старости и телесне масе какви се обично обрађују у живинарским кланицама (тј. пилићи стари приближно 7 недеља телесне масе 1,5 kg до 2,5 kg).

1.3.2. Сакупљање и транспорт очију у лабораторију

Главе се уклањају непосредно по омамљивању пилића, обично струјним ударом и засецањем врата ради искрвављења. Требало да буде лоциран локални извор пилића (у близини лабораторије) тако да њихове главе могу да се пренесу из кланице у лабораторију довољно брзо како би се свело на минимум пропадање и/или контаминација бактеријама. Временски размак између сакупљања пилећих глава и употребе очију у методи испитивања ICE своди се на минимум (обично у року од два сата), како се не би умањила вредност резултата испитивања. Ови резултати су засновани на критеријумима за избор очију и одговорима позитивних и негативних контрола. Све очи употребљене у испитивању припадају истој групи очију сакупљеној у одређеном дану.

Пошто се очи сецирају у лабораторији, интактне главе се транспортују из кланице на собној температури у пластичним кутијама и навлажене убрусима натопљеним изотоничним физиолошким раствором.

1.3.3. Критеријуми за избор за очију које се користе у ICE

Очи које имају високу базну линију бојења флуоресцином (тј. > 0,5) или скор замућења рожњаче (тј. > 0,5) одбацују се након изолације.

Свака испитивана група и паралелна позитивна контрола се састоји од најмање три ока. За негативну контролну групу

или контролу растварача (ако се уместо физиолошког раствора користи неки други растварач) користи се најмање једно око.

1.4. ПОСТУПАК

1.4.1. Припрема ока

Очни капци се пажљиво исецају, водећи рачуна да се не оштетити рожњача. Целовитост рожњаче се брзо оцењује тако што се на њену површину на неколико секунди нанесе кап 2% (w/v) натријум флуоресцеина, а затим се испере изотоничним физиолошким раствором. Очи третиране флуоресцеином се затим прегледају микроскопом са слит-лампом како би се проверило да ли је рожњача неоштећена (тј. задржавање флуоресцеина и скор замућење рожњаче мора бити ≤ 0,5).

Ако је неоштећено око се затим исеца из лобање, водећи рачуна да се не оштетити рожњача. Очна јабучица се повуче из очне дупље тако да се трепавица чврсто ухвати хируршком пинцетом, и очни мишићи исеку савијеним маказама са тупим врхом. Важно је да се избегне оштећење рожњаче због прекомерног притиска (тј. предмета за стезање).

Када се око извади из очне дупље, видљиви део оптичког нерва остаје спојен. Када се извади из очне дупље, око се ставља на упијајућу подлогу, а трећи очни капак и друго везивно ткиво се одсеку.

Извађено око ставља се у стезаљку од нерђајућег челика са рожњачом у вертикалном положају. Стезаљка се пренесе у комору уређаја за суперфузију[16]. Стезаљка је постављена у уређај за суперфузију тако да је цела рожњача снабдевена капима физиолошког раствора. Температура у коморама уређаја за суперфузију је контролисана на 32° C ± 1,5° C. У Додатку 3. ове методе дат је дијаграм типичног уређаја за суперфузију и стезаљке за око, који се могу наћи на тржишту или направити. Уређај се може прилагодити потребама појединих лабораторија (нпр. да се направи места за различит број очију).

Након што се ставе у уређај за суперфузију, очи се поново испитују микроскопом са слит-лампом како би се проверило да нису оштећене током поступка сецирања. Дебљина рожњаче се мери и у овој фази на највишој тачки рожњаче елементом за мерење дубине на микроскопу са слит-лампом. Замењују се очи са 1) скором задржавања флуоресцеина > 0,5; 2) замућења рожњаче > 0,5 или 3) било каквим додатним знацима оштећења. Од очију које се не одбаце на основу било којег од ових критеријума, одбацују се појединачне очи са рожњачом чија дебљина одступа више од 10% од средње вредности за све очи. Микроскопи са слит-лампом могу да покажу различите вредности дебљине рожњаче ако је ширина прореза другачије подешена. Ширина прореза је подешена на 0,095 mm.

Када се све очи испитају и одобре, очи се инкубирају од 45 минута до 60 минута да се пре примена дозе доведу у равнотежу са системом за испитивање. Након периода уравнотежавања, као базна линија за дебљину и замућење рожњаче бележи се нулта референтна вредност (тј. време = 0). Скор флуоресцина одређен при сецирању користи се као базна линија за тај ефекат.

1.4.2. Примена испитиване супстанце

Одмах након мерења нултих референтних вредности, око (у свом држачу) се уклања из уређаја за суперфузију, ставља у хоризонталан положај, а испитивана супстанца се наноси на рожњачу.

Испитиване супстанце у течном стању се обично испитују неразблажене, али по потреби могу да се разблаже (нпр. као део дизајна испитивања). Најпогоднији као растварач за разблажене супстанце је физиолошки раствор. Међутим, под контролисаним условима могу да се користе и алтернативни растварачи, али се приказује и прикладност растварача, осим физиолошког раствора.

Испитиване супстанце у течном стању наносе се на рожњачу тако што се целокупна површина рожњаче равномерно прекрије испитиваном супстанцом; стандардна запремина је 0,03 mL.

Ако је могуће, супстанце у чврстом стању се уситњавају што је више могуће тучком у авану или сличним средством за дробљење. Прашак се наноси на рожњачу тако да површина буде равномерно прекривена испитиваном супстанцом; стандардна количина је 0,03 g.

Испитивана супстанца (у течном или чврстом стању) остави се да делује 10 секунди, а затим се испере из ока физиолошким раствором (око 20 mL) на собној температури. Око (у држачу) се потом врати у уређај за суперфузију у првобитни усправни положај.

1.4.3. Контроле

Сваки експеримент обухвата паралелну негативну контролу или контролу растварача/носача и позитивне контроле.

При испитивању супстанци у течном стању у концентрацији 100% или чврстих супстанци, физиолошки раствор се користи као паралелна негативна контрола у методи ICE да се открију неспецифичне промене у систему за испитивање и да се провери да ли услови испитивања проузрокују иритативни одговор.

Приликом испитивања разблажених течних хемикалија, у испитивање се укључује паралелна контролна група растварача/носача, да се открију неспецифичне промене у систему за испитивање и да се провери да ли услови испитивања узрокују иритативни одговор. Може се користити само растварач/носач за који је доказано да нема штетних ефеката на систем за испитивање.

У свако испитивање, као паралелна позитивна контрола, укључују се супстанце познате као иритативне за око како би се проверило да ли долази до очекиваног одговора. Како се ICE користи у овој методи испитивања да се идентификују супстанце које изазивају тешко оштећење ока или јаку иритацију, позитивна контрола је референтна супстанца која у овој

методи испитивања изазива јак одговор. Да би се обезбедило да варијабилност у одговору позитивне контроле може да се оцењује у даљем временском периоду, степен јачине одговора не сме бити претеран. За позитивну контролу се сакупља довољно података *in vitro* како би се могао израчунати статистички дефинисан прихватљив распон позитивне контроле. Ако за одређену позитивну контролу не постоје одговарајуће подаци добијени методом ICE из ранијих испитивања, спроводе се студије у којима ће се ови подаци прикупити.

Примери позитивних контрола за испитиване супстанце у течном стању су 10%-тна сирћетна киселина или 5%-тни бензалконијум хлорид, док су примери позитивне контроле за испитиване супстанце у чврстом стању натријум хидроксид или имидазол.

Референтне супстанце су погодне за оцену потенцијала иритативности за око који непознате хемикалије специфичне класе једињења или производа имају, или за оцену релативног иритативног потенцијала иританаса за око у одређеном опсегу иритативних одговора.

1.4.4. Мерење ефеката

Третиране рожњаче се евалуирају пре испитивања и са почетком у 30, 75, 120, 180 и 240 минута (± 5 минута) по испирању које се врши након третмана. Ови временски интервали обезбеђују адекватан број мерења током четворосатног третмана и остављају довољно времена између мерења да се спроведу неопходна посматрања свих очију.

Ефекти који се евалуирају су замућење рожњаче, надутост, задржавање флуоресцеина, и морфолошки ефекти (нпр. удубљивање или опуштање епитела). Сви ефекти, изузев задржавања флуоресцеина (што се одређује само пре третмана и 30 минута после излагања испитиваној супстанци) одређују се у сваком од горе наведених временских интервала.

Препоручује се фотографисање ради документовања замућења рожњаче, задржавања флуоресцеина, морфолошких ефеката и, ако се спроводи, хистопатологија.

После завршног прегледа након четири сата, препоручује се да корисници чувају очи у одговарајућем фиксативу (нпр. неутрални пуферовани формалин) за евентуално хистопатолошко испитивање.

Надутост рожњаче се одређује мерењем дебљине рожњаче оптичким пахиметром на микроскопу са слит-лампом. Изражава се као проценат и израчунава се на основу мерења дебљине рожњаче према следећој формули:

$$\left(\frac{\text{дебљина рожњаче у времену } t - \text{дебљина рожњаче у времену} = 0}{\text{дебљина рожњаче у времену} = 0}\right) \times 100$$

Средњи проценат надутости рожњаче за све испитиване очи рачуна се за свако време посматрања. На основу највишег средњег скора надутости рожњаче, која је забележена у било које време, за сваку испитивану супстанцу одређује се укупни скор за категорију.

Код процењивања замућења рожњаче користи се површина рожњаче која је најмање замућена. Средња вредност замућења рожњаче за све испитиване очи израчунава се за свако време посматрања. На основу највишег средњег скора замућења рожњаче, који је забележен у било које време, за сваку испитивану супстанцу одређује се укупни скор категорије (Табела 1).

Табела 1. Скорови замућења рожњаче

Скор	Запажање
0	Није замућена
0,5	веома мало замућена
1	Расуте или дифузне области; делови дужице су јасно видљиви
2	лако уочљива област која пропушта светлост; делови дужице мало мутни
3	Веома замућена рожњача; нису видљиви специфични делови дужице, величина зенице се једва распознаје
4	Потпуна замућење рожњаче; дужица се не види

Средња вредност задржавања флуоресцеина за све испитиване очи се израчунава само за време посматрања од 30 минута и за сваку испитивану супстанцу се додељује као укупни скор категорије (Табела 2).

Табела 2. Скорови задржавања флуоресцеина

Скор	Запажање
0	Без задржавања флуоресцеина
0,5	Веома мала обојеност појединачних ћелија
1	Обојеност појединих ћелија расутих широм третиране области рожњаче

2	Фокусна или конфлуентна обојеност појединих ћелија
3	Велике сливене области рожњаче у којима се задржава флуоресцеин

Морфолошки ефекти укључују удубљивање епителних ћелија рожњаче, опуштање епитела, храпављење површине рожњаче и лепљење испитиване супстанце за рожњачу. Ови налази могу да варирају у јачини и могу се појавити истовремено. Класиковање ових налаза је субјективно у зависности од тумачења испитивача.

2. ПОДАЦИ И ИЗВЕШТАВАЊЕ

2.1. Оцењивање података

Резултати за замућење рожњаче, надутост и задржавање флуоресцеина посебно се оцењују да се формира класа ICE за сваки ефекат. Класе ICE за сваки ефекат се затим комбинују да дају класификацију на основу иритативности за сваку испитивану супстанцу.

2.1. Критеријуми за одлучивање

Када се евалуирају сви ефекти, на основу унапред утврђених опсега могу се доделити класе ICE. Дебљина рожњаче (Табела 3), замућење (Табела 4) и задржавање флуоресцеина (Табела 5) тумаче се помоћу четири ICE класе према следећим скалама:

Табела 3. Критеријуми за ICE класификацију дебљине рожњаче

Средња надутост рожњаче (%) [*]	Класа ICE
0 до 5	I
> 5 до 12	II
> 12 до 18 (> 75 min после третмана)	II
> 12 до 18 (≤ 75 min после третмана)	III
> 18 до 26	III
> 26 до 32 (> 75 min после третмана)	III
> 26 до 32 (≤ 75 min после третмана)	IV
> 32	IV
[*] Скорови надутости рожњаче су примењиви само ако је мерење извршено помоћу микроскопа са Haag-Streit BP900 слит лампом, са елементом за мерење дубине № I подешавањем ширине 9½ (0,095 mm). Микроскопи са оваквом лампом могу дати различите резултате мерења за дебљину рожњаче ако је слит ширина другачије подешена.	

Табела 4. Критеријуми за ICE класификацију замућења

Средњи највиши скор замућења [*]	Класа ICE
0,0-0,5	I
0,6-1,5	II
1,6-2,5	III
2,6-4,0	IV
[*] Видети Табелу 1.	

Табела 5. Критеријуми за ICE класификацију средњи скор задржавања флуоресцеина

Средњи скор задржавања флуоресцеина 30 минута после третмана [*]	Класа ICE
0,0-0,5	I
0,6-1,5	II
1,6-2,5	III
2,6-3,0	IV
[*] Видети Табелу 2.	

Општа класификација испитиваних супстанци за иритативност *in vitro* процењује се очитавањем класификације иритативности која одговара комбинацији категорија добијених за надутост рожњаче, замућење рожњаче и задржавање флуоресцеина и употребом формула из Табеле 6.

Табела 6. Укупна класификација за иритативност *in vitro*

Класификација	Комбинације три ефекта
Тешко оштећење ока/јака иритација ока	3 × IV 2 × IV, 1 × III 2 × IV, 1 × II [*] 2 × IV, 1 × I [*] замућење рожњаче ≥ 3 на 30 минута (у најмање 2 ока) замућење рожњаче = 4 у било које време (код најмање 2 ока) Озбиљно опуштање епитела (код најмање 1 ока)
[*] Мања вероватноћа да ће се ови ефекти комбиновати	

Као што је наведено у одељку 1.2. ове методе ако испитивана супстанца није идентификована као она која изазива тешко оштећење или јаку иритацију ока, врши се додатно испитивање ради класификације и обележавања. У примерима са подацима из методе *in vivo* на оку кунића за одређивање супстанци које изазивају тешко оштећење ока и које су јаки иританси за око, класификованих према системима класификације ЕРА[1], ЕУ[2], или ГХС[3], укупна тачност методе испитивања ICE је 83% (120/144) до 87% (134/154), удео лажно позитивних резултата 6% (7 / 122) до 8% (9 /116), а лажно негативних резултата 41% (13/32) до 50% (15/30). Када се из базе података искључе супстанце из одређених класа једињења(тј. алкохоли и сурфактанти) и агрегатних стања (нпр. чврсто стање), тачност испитивања ICE према системима класификације ЕУ, ЕРА и ГХС креће се од 91% (75/82) до 92% (69/75), удео лажно позитивних резултата крећу се од 5% (4/73) до 6% (4/70), а лажно негативних креће се од 29% (2/7) до 3% (3/9)[4].

Чак и ако се супстанце не могу класификовати у класу тешког оштећења ока или јаке иритације ока, подаци добијени са ICE у комбинацији са подацима из испитивања *in vivo* на оку кунића или одговарајуће валидираним испитивањем *in vitro* корисни за даљу евалуацију корисности и ограничења методе ICE за утврђивање мање иритативних и супстанци које нису иритативне (Смернице за употребу метода испитивања *in vitro* за одређивање токсичности за око су у припреми).

2.2. Критеријуми за прихватљивост студије

Испитивање се сматра прихватљивим ако паралелне негативне или контроле носача/растварача и паралелне позитивне контроле дају класификацију иритативности у није иритативно, односно тешко оштећење/јака иритација ока.

3. ИЗВЕШТАЈ О ИСПИТИВАЊУ

Извештај о испитивању садржи податке о (ако су релевантни за спровођење студије):

1) Испитиваним и контролним супстанцама:

– хемијски назив, нпр. назив из номенклатуре IUPAC или CAS назив и CAS број, ако су познати;

– регистарски број (RN) CAS, ако је познат;

– чистоћа и састав супстанци или смеша (у масеним процентима), ако је таква информација доступна;

– физичко-хемијска својства, релевантна за спровођење студије, нпр. агрегатно стање, испарљивост, pH вредност, стабилност, класа једињења, растворљивост у води;

– обрада испитиваних/контролних супстанци пре испитивања, ако је потребно (нпр. загревање, уситњавање);

– стабилност, ако је позната.

2) Спонзору и испитиваној лабораторији:

– име и адреса спонзора, испитиване лабораторије и руководиоца студије;

– подаци о извору очију (нпр. објекат из кога су прикупљене);

– складиштење и услови транспорта очију (нпр. датум и време сакупљања очију, временски интервал пре почетка испитивања);

– ако је могуће, посебне карактеристике животиња од којих су сакупљене очи (нпр. старост, пол, телесна маса животиње даваоца).

3) Оправданости методе испитивања и поступак који је коришћен.

4) Интегритету методе испитивања:

– поступак да се обезбеди исправност (тј. тачност и поузданост) методе испитивања у током времена (нпр. периодична испитивања супстанци за проверу способности, коришћење података о негативним и позитивним контролама из ранијих испитивања).

5) Критеријумима за прихватање испитивања:

– ако је примењиво, прихватљиви опсези референтне контроле на основу података из ранијих испитивања.

6) Условима испитивања:

– опис коришћеног система за испитивање;

– коришћени микроскоп са слит-лампом (нпр, модел);

– подешавања за микроскоп са слит-лампом;

– подаци о употребљеним очима пилића, укључујући изјаве о њиховом квалитету;

– детаљи о коришћеном поступку испитивања;

– коришћене концентрације испитиваних супстанци;

– опис сваке измене поступка испитивања;

– позивање на податке из ранијих испитивања модела (тј. негативних и позитивних контрола, супстанце за проверу способности, референтне супстанце);

– опис коришћених критеријума за евалуацију;

7) Резултатима:

– опис других примећених ефеката;

– по потреби, фотографије ока.

8) Тумачењу резултата.

9) Закључцима.

4. ЛИТЕРАТУРА

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

2. Regulation (EC) No 1272/2008 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on classification, labelling and packaging of substances and mixtures, amending and repealing Directive 67/548/EEC and 1999/45/EC, and amending Regulation (EC) No 1907/2006. OJ L 353, 31.12.2008, p. 1.

3. United nations (UN) (2007). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Second revised edition, UN New York and Geneva, 2007. Available at: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev02/02files_e.html

4. ICCVAM (2007). Test Method Evaluation Report - In Vitro Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No: 07-4517. Available: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm

5. ESAC (2007). Statement on the conclusion of the ICCVAM retrospective study on organotypic in vitro assays as screening tests to identify potential ocular corrosives and severe eye irritants. Available: http://ecvam.jrc.it/index.htm.

6. Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council of 18 December 2006 concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH), establishing a European Chemicals Agency, amending Directive 1999/45/EC and repealing Council Regulation (EEC) No 793/93 and Commission Regulation (EC) No 1488/94 as well as Council Directive 76/769/EEC and Commission Directives 91/155/EEC, 93/67/EEC, 93/105/EC and 2000/21/EC. OJ L 396, 30.12.2006, p. 1.

7. OECD (2002). Test Guideline 405. OECD Guideline for Testing of Chemicals. Acute eye irritation/corrosion. Available: http://www.oecd.org/document/40/0, 2340, en_2649_34377_37051368_1_1_1_1,00.html

8. ICCVAM (2007). ICCVAM Recommended ICE Test Method Protocol. In: ICCVAM Test Method Evaluation Report - In Vitro Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No: 07-4517. Available: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm

9. ICCVAM. (2006). Current Status of In Vitro Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Isolated

Chicken Eye Test Method. NIH Publication No: 06-4513. Research Triangle Park: National Toxicology Program. Available: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_ice.htm

10. Prinsen, M.K. and Koëter, B.W.M. (1993). Justification of the enucleated eye test with eyes of slaughterhouse animals as an alternative to the Draize eye irritation test with rabbits. Fd. Chem. Toxicol. 31:69-76.

11. INVITTOX (1994). Protocol 80: Chicken enucleated eye test (CEET). Available: http://ecvam.jrc.it/index.htm

12. Balls, M., Botham, P.A., Bruner, L.H. and Spielmann H. (1995). The EC/HO international validation study on alternatives to the Draize eye irritation test. Toxicol. In Vitro 9:871-929.

13. Prinsen, M.K. (1996). The chicken enucleated eye test (CEET): A practical (pre)screen for the assessment of eye irritation/corrosion potential of test materials. Food Chem. Toxicol. 34:291-296.

14. Chamberlain, M., Gad, S.C., Gautheron, P. and Prinsen, M.K. (1997). IRAG Working Group I: Organotypic models for the assessment/prediction of ocular irritation. Food Chem. Toxicol. 35:23-37.

15. Siegel, J.D., Rhinehart, E., Jackson, M., Chiarello, L., and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (2007). Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings. Available: http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/isolation2007.pdf

16. Maurer, J.K., Parker, R.D. and Jester J.V. (2002). Extent of corneal injury as the mechanistic basis for ocular irritation: key findings and recommendations for the development of alternative assays. Reg. Tox. Pharmacol. 36:106-117.

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

18. ICCVAM (2006). Background review document, Current Status of In Vitro Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) Test Method. Available: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm

19. ICCVAM (2006). Background review document, Current Status of In Vitro Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe IrritantsIsolated Chicken Eye (ICE) Test Method. Available: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm

Део други

ДОДАТАК 1.

ДЕФИНИЦИЈЕ

Тачност јесте степен уједначености између резултата испитивања и прихваћених референтних вредности. Мерило је карактеристика методе испитивања и један од аспеката релевантности. Овај термин се често користи у истом значењу као „усклађеност” како би се означио удео тачних резултата методе испитивања.

Референтна супстанца јесте супстанца која се користи као стандард за поређење са испитиваном супстанцом. Референтна супстанца има следећа својства: 1) сталан и поуздан извор; 2) структурну и функционалну сличност са класом једињења које се испитује; 3) позната физичка/хемијска својства; 4) податке о познатим ефектима и 5) познати потенцијал у опсегу очекиваног одговора.

Рожњача јесте прозирни део предњег дела очне јабучице који покрива вежњачу и дужицу и пропушта светлост у унутрашњост.

Замућење рожњаче јесте мера обима замућености рожњаче након излагања испитиваној супстанци. Повећано замућење рожњаче указује на оштећење рожњаче. Замућење се може евалуирати субјективно као код Драјзеове методе на оку кунића, или објективно помоћу инструмента као што је опацитометар.

Надутост рожњаче јесте објективно мерење у методи ICE, да се утврди степен надутости рожњаче након излагања испитиваној супстанци. Изражава се у процентима и израчунава се од базне линије (вредности пре наношења) измерених вредности дебљине рожњаче и дебљина забележених у испитивању ICE у редовним интервалима након излагања испитиваној хемикалији. Степен надутости рожњаче указује на оштећење рожњаче.

EPA категорија 1 јесте корозивно (иреверзибилно уништавање ткива ока) које оштећује рожњачу или изазива иритацију која се одржава више од 21 дан[1].

ЕУ категорија R41 јесте оштећење ткива ока, или озбиљно физичко пропадање вида, након наношења испитиване супстанце на предњу површину ока, која није у потпуности реверзибилна у року од 21 дана од примене[2].

Удео лажно негативних јесте удео свих позитивних супстанци које су методом испитивања погрешно идентификоване као негативне. Један је од показатеља карактеристика методе испитивања.

Удео лажно позитивних јесте удео свих негативних супстанци које су методом испитивања погрешно идентификоване као позитивне. Један је од показатеља карактеристика методе испитивања.

Задржавање флуоресцеина јесте субјективно мерење при испитивању ICE у којем се одређује степен натријум флуоресцина који се задржава у епителним ћелијама у рожњачи након излагања испитиваној супстанци. Степен задржавања

флуоресцеина указује на оштећење епитела рожњаче.

ГХС јесте Глобално хармонизовани систем за класификацију и обележавање хемикалија односно систем који предлаже класификацију хемикалија (супстанци и смеша) према стандардизованим врстама и нивоима физичких опасности и опасности по здравље људи и животну средину, који обухвата и одговарајуће елементе комуникације, као што су: пиктограми, знакови опасности, писана упозорења, ознаке ризика и безбедности, и безбедносни листови, да би се пренела информација о њиховим штетним ефектима са циљем да се заштите људи (укључујући послодавце, раднике, превознике, потрошаче и пружаоце помоћи у ванредним ситуацијама) и животна средина[3].

ГХС категорија 1 јесте оштећење ткива ока, или озбиљно физичко пропадање вида, након наношења испитиване супстанце на предњу површину ока, која није потпуно реверзибилна у року од 21 дана од примене[3].

Опасност јесте својство агенса или ситуације које може да доведе до штетних ефеката када су организам, систем или (суб)популација изложени том агенсу.

Негативна контрола јесте нетретирани узорак који садржи све компоненте система за испитивање. Овај узорак се обрађује са узорцима третираним испитиваном супстанцом и другим контролним узорцима да утврди има ли интеракције између растварача и система за испитивање.

Хемикалија која није иритативна јесу супстанце које нису класификоване као супстанце иритативне за око ЕРА категорије 1, 2, или 3 ЕУ категорије R41 или R36; или ГХС категорије 1, 2А или 2Б.

Хемикалија која изазива тешко оштећење ока јесте: а) супстанца која изазива иреверзибилно оштећење ткива ока; б) супстанце које су класификоване као иритативне за око ГХС категорије 1, ЕРА категорије I или ЕУ категорије R41[1,2,3].

Иритативно за око јесте: а) супстанца која доводи до реверзибилне промене у оку након наношења на предњу површину ока; б) супстанце које су класификоване као супстанце иритативне за око ЕРА категорије II или III, ЕУ категорије R36 или ГХС категорије 2А или 2Б[1,2,3].

Јако иритативно за око јесте: а) супстанца која изазива оштећење ткива ока након наношења на предњу површину ока које се не повлачи у року од 21 дана од дана наношења или изазива озбиљно физичко пропадање вида, б) супстанце које су класификоване као супстанце иритативне за око ГХС категорије 1, ЕРА категорије I или ЕУ категорије R41[1,2,3].

Позитивна контрола јесте узорак који садржи све компоненте система за испитивање и који се третира супстанцом за коју се зна да изазива позитивни одговор. Да би се обезбедило да варијабилност у одговору позитивне контроле може да се оцењује током времена, јачина одговора не сме да буде претерана.

Поузданост показује у којој мери метода испитивања може да се понавља унутар једне лабораторије и између више лабораторија током времена уз примену истог поступка. Оцењује се израчунавањем поновљивости унутар једне лабораторије и између више лабораторија.

Микроскоп са слит-лампом јесте инструмент који се користи за директно испитивање ока под увећањем бинокуларног микроскопа стварањем стереоскопске, усправне слике. У методи испитивања ICE, овај инструмент се користи за преглед предњих структура ока пилета, као и да се објективно измери дебљина рожњаче са додатком за мерење дубине.

Контрола растварача/носача јесте нетретирани узорак који садржи све компоненте система за испитивање, укључујући растварач или носач који се обрађује са узорцима третираним испитиваном супстанцом и другим контролним узорцима како би се утврдила базна линија одговора за узорке третиране испитиваном супстанцом растворeном у том растварачу или носачу. Када се испитује са паралелном негативном контролом, овај узорак показује и да ли растварач или носач реагује са системом за испитивање.

Вишестепено испитивање јесте стратегија испитивања корак по корак где се одређеним редоследом прегледају све постојеће информације о испитиваној супстанци, при чему се на сваком степену користи поступак процене квалитета података да би се утврдило да ли постоји довољно информација за одлуку о класификовању супстанце као опасне, пре преласка на следећи степен. Ако се на основу постојећих информација може приписати иритативни потенцијал испитиваној супстанци, није потребно додатно испитивање. Ако се на основу постојећих информација не може приписати иритативни потенцијал испитиване супстанце, изводи се поступак вишестепеног испитивања корак по корак на животињама док не буде могуће извршити недвосмислену класификацију.

Валидирана метода испитивања јесте метода испитивања код које су на основу извршених студија валидације утврђени релевантност (укључујући и тачност) и поузданост за одређену намену. Важно је напоменути да валидирана метода испитивања не мора да има задовољавајуће карактеристике у погледу тачности и поузданости да би била прихватљива за предложену намену.

Квалитет података јесте поступак разматрања предности и слабости различитих информација да се донесе и подржи закључак у погледу потенцијалне опасности супстанце.

ДОДАТАК 2.
СУПСТАНЦЕ ЗА ПРОВЕРУ СПОСОБНОСТИ ЗА ИЗВОЂЕЊЕ МЕТОДЕ ИСПИТИВАЊА ICE

Пре рутинског коришћења методе испитивања која испуњава захтеве ове методе испитивања, лабораторије ће можда желети да покаже техничку стручност тако што ће правилно класификовати 10 супстанци препоручених у Табели 1. која је дата у овој методи у погледу њиховог својства да изазивају тешко оштећење ока. Ове супстанце су изабране да представљају опсег одговора за локалну иритацију/тешко оштећење ока, на основу резултата испитивања *in vivo* на оку кунића (Упутство

за испитивање OECD 405) (тј. категорије 1, 2А, 2Б, или некласификоване и обележене према УН ГХС[3,7]. С обзиром да је потврђена корисност ових испитивања (тј. да се идентификују само супстанце које изазивају тешко оштећење/иритацију ока), постоје само два исхода испитивања у сврху класификације (изазивају тешко оштећење ока и јако иритативне за око или не изазивају тешко оштећење ока и нису јако иритативне) која показују оспособљеност. Други критеријуми за избор супстанци били су да се оне могу наћи у промету, да постоје висококвалитетни референтни подаци *in vivo*, а постоје и квалитетни подаци из две методе *in vitro* за које се израђују Смернице за испитивање. Из тог разлога, иритативне супстанце су изабране са препорученог списка ICCVAM од 122 референтне супстанце за валидацију метода испитивања *in vitro* за утврђивање токсичности за око (видети литературу[5]). Референтни подаци се могу наћи у ранијем прегледу методе испитивања BCOP и методе на изолованом оку пилета (ICE)[18,19].

Табела 1. Препоручене супстанце за показивање техничке оспособљености за ICE

Супстанца	CAS бр.	класа једињења [1]	агрегатно стање	Класифи-кација *In Vivo* [2]	Класифи-кација *In Vitro* [3]
бензалконијум хлорид (5%)	8001-54-5	онијум једињење	Течно	Категорија 1	тешко оштећење ока/јако иритативно за око
хлорхексидин	55-56-1	амин, амидин	чврсто	Категорија 1	корозивна/ јако иритативна супстанца
дибензоил-L-винска киселина	2743-38-6	карбоксилна киселина, естар	чврсто	Категорија 1	тешко оштећење ока/јако иритативно за око
имидазол	288-32-4	хетероциклично једињење	чврсто	Категорија 1	тешко оштећење ока/јако иритативно за око
трихлорсирћетна киселина (30%)	76-03-9	карбоксилна киселина	течно	Категорија 1	тешко оштећење ока/јако иритативно за око
2,6-дихлоробензоил хлорид	4659-45-4	ацил-халогенид	течно	Категорија 2А	не изазива тешко оштећење ока/ ни јаку иритацију ока
етил-2-метилацетоацетат	| 609-14-3	кетон, естар	течно	Категорија 2Б	не изазива тешко оштећење ока/ ни јаку иритацију ока
амонијум-нитрат	6484-52-2	неорганска со	чврсто	Категорија 2А	не изазива тешко оштећење ока/ ни јаку иритацију ока
глицерол	56-81-5	алкохол	течно	није класификована	не изазива тешко оштећење ока/ ни јаку иритацију ока
n-хексан	110-54-3	угљоводоник (ациклични)	течно	није класификкована	не изазива тешко оштећење ока/ ни јаку иритацију ока

Скраћенице (Chemical Abstracts Service Registry Number, CASRN):

[1] Хемијске класе су додељене свакој испитиваној супстанци користећи стандардну шему класификације, на основу систем класификације медицинског предметног регистра Националне медицинске библиотеке (доступан на http://www.nlm.nih.gov/mesh).

[2] На основу резултата добијених испитивањем *in vivo* на оку кунића (OECD TG 405) и користећи УН ГХС[3,7.]

[3] На основу резултата у BCOP и ICE.

ДОДАТАК 3.
ДИЈАГРАМИ УРЕЂАЈА ЗА СУПЕРФУЗИЈУ КОЈИ СЕ КОРИСТИ У МЕТОДИ ICE И СТЕЗАЉКЕ ЗА ОКО

За додатне генеричке описе уређаја за суперфузију и стезаљке за око видети литературу[17].

ПОПРЕЧНИ ПРЕСЕК ОДЕЉКА

ДРЖАЧ ОКА

ЕЛЕМЕНАТ БР.	ОПИС
1	ОДВОД ТОПЛЕ ВОДЕ
2	КЛИЗНА ВРАТА
3	УРЕЂАЈ ЗА СУПЕРФУЗИЈУ
4	ОПТИЧКИ МЕРНИ ИНСТРУМЕНТ
5	ДОВОД ТОПЛЕ ВОДЕ
6	ФИЗИОЛОШКИ РАСТВОР
7	ТОПЛА ВОДА
8	ДОВОД ФИЗИОЛОШКОГ РАСТВОРА
9	ОДЕЉАК
10	ДРЖАЧ ОКА
11	ОКО ПИЛЕТА
12	ОДВОД ФИЗИОЛОШКОГ РАСТВОРА
13	ЗАВРТАЊ ЗА ПРИЧВРШЋИВАЊЕ
14	ПОДЕСИВА ГОРЊА ДРШКА
15	ФИКСИРАНА ДОЊА ДРШКА

Прилог 3.

C.1. АКУТНА ТОКСИЧНОСТ ПО РИБЕ

Део први

1. МЕТОДА ИСПИТИВАЊА

1.1. УВОД

Сврха ове методе је да се за испитивану супстанцу утврди летална акутна токсичност по слатководне рибе. У испитивању се користи систем (статички, полустатички или проточни) који је најприкладнији за константно одржавање испитиваних концентрација супстанце у води. Избор је олакшан када се располаже подацима о растворљивости у води, напону паре, хемијској стабилности, константама дисоцијације и биоразградљивости супстанце.

Додатне податке (нпр. подаци о структурној формули, степену чистоће, врсти и проценту значајних нечистоћа, присуству и количини адитива, коефицијент расподеле у систему*n*-октанол/вода) узети у обзир при планирању испитивања и при тумачењу добијених резултата.

1.2. ДЕФИНИЦИЈЕ И МЕРНЕ ЈЕДИНИЦЕ

Акутна токсичност јесте видљиви штетан ефекат који настаје у организму услед излагања супстанци у току кратког временског периода (дани). У испитивању, акутна токсичност изражава се као средња летална концентрација (у даљем тексту: LC_{50}), односно концентрација супстанце у води која доводи до смрти 50% јединки испитиване групе риба, које су непрекидно изложене у току унапред назначеног временског периода.

Све концентрације супстанци које се испитују изражавају се у јединицама масе по запремини (mg/l) или у масеним концентрацијама (mg/kg).

1.3. РЕФЕРЕНТНЕ СУПСТАНЦЕ

На основу резултата испитивања са референтном супстанцом може да се утврди да ли је у лабораторијским условима испитивања дошло до значајне промене осетљивости врсте на којој се врши испитивање.

За ову методу испитивања нису прописане референтне супстанце.

1.4. ПРИНЦИП МЕТОДЕ

Прелиминарно испитивање супстанце врши се за концентрацију од 100 mg/l, како би се утврдило да је вредност LC_{50} виша од ове концентрације.

Испитивање траје 96 сати. У току овог времена рибе се излажу испитиваној супстанци која се додаје у воду у опсегу концентрација. На најмање свака 24 сата, бележи се смртност риба и притом се, кад год је могуће, израчунава вредност LC_{50}.

1.5. КРИТЕРИЈУМИ КВАЛИТЕТА

Критеријуми квалитета примењују се на читаву методу испитивања, укључујући и прелиминарно испитивање.

На крају испитивања смртност у контролним групама не сме да прелази 10% (или више од једне рибе у контролној групи са мање од 10 јединки).

У току читавог испитивања концентрација раствореног кисеоника у води је виша од 60% засићења.

У току трајања испитивања, концентрације испитиване супстанце одржавати у границама од 80% од почетних концентрација.

За супстанце које се лако растварају у испитиваном медијуму и образују стабилне растворе, односно растворе који у знатној мери не испаравају, не распадају се, не подлежу хидролизи или се не адсорбују, може се узети да је почетна концентрација једнака номиналној концентрацији. Све време трајања испитивања требало би да буду задовољени критеријуми квалитета и концентрације супстанце одржане у оквиру прописаних вредности, за шта се прилажу докази.

За супстанце које су слабо растворљиве у испитиваном медију или имају способност образовања стабилних емулзија, или дисперзија, или нису стабилне у воденим растворима, за почетну концентрацију обавезно се узима вредност концентрације која је измерена у раствору (или ако не постоји техничка могућност, концентрација измерена у воденом стубу) на почетку испитивања. Концентрација супстанце се одређује након периода стабилизације и то пре увођења риба у систем за испитивање.

У току самог испитивања спроводе се додатна мерења како би се потврдиле стварне концентрације излагања, као и испуњавање критеријума квалитета.

Вредност pH не варира за више од 1.

1.6. ОПИС МЕТОДЕ

У испитивању се користе три различита система:

1) статичан:

- у току испитивања нема протока испитиваног раствора (раствори се не обнављају у коморама за испитивање);

1) полустатичан:

- испитивани раствор не протиче, али се у коморама за испитивање раствори редовно обнављају у дужим временским интервалима (нпр. на свака 24 сата).

2) проточни:

- испитивани раствор се стално обнавља, чиме се обезбеђује стална концентрација раствора и спречава нагомилавање контаминената у коморама за испитивање.

1.6.1. Реагенси

1.6.1.1. Раствори испитиване супстанце

За припрему основних раствора у концентрацијама предвиђеним за испитивање употребљава се дејонизована вода или обична вода у складу са спецификацијом из одељка 1.6.1.2. ове методе.

Концентрације које су одређене за испитивање припремају се разблаживањем основног раствора. Ако се испитују високе концентрације, супстанца се може одмах растворити у води која се користи за разблаживање.

Супстанце се испитују док се не достигне граница растворљивости. За неке супстанце, нпр. оне супстанце које имају ниску растворљивост у води или високу вредност коефицијента расподеле у систему *n*-октанол/вода (у даљем тексту: P_{ow}) или оне супстанце које пре образују стабилне дисперзије него праве водене растворе, прихватљиво је да се изврши испитивање концентрације супстанце која је изнад границе растворљивости, како би потврдили да је постигнута концентрација максималне растворљивости, односно стабилна концентрација. Треба имати у виду да ова концентрација на неки други начин не омета систем за испитивање (нпр. образовањем површинског слоја који спречава оксигенацију воде, итд.).

Ултразвучна дисперзија, органски растварачи, емулгатори или дисперзиона средства могу се употребити за припрему основног раствора супстанце чија је растворљивост у води ниска или да би се поспешила дисперзија у испитиваном медијуму. У случају да се користе, све испитиване концентрације садрже исту количину помоћних супстанци. Истој концентрацији помоћних супстанци, која се користи у серијама испитивања, излажу се и рибе у додатној контролној групи. Концентрацију помоћних супстанци у испитиваном медијуму свести на минимум и она ни у ком случају не сме премашити вредност од 100 mg/l.

Испитивање се изводи без подешавања pH вредности. Ако се утврди да је дошло до значајне промене pH вредности,

прилажу се резултати добијени у поновљеном испитивању за које је pH вредност претходно била подешена. pH вредност основног раствора се подешава према pH вредности воде за разблаживање, осим ако не постоји конкретан разлог да се тако не уради. У ту сврху првенствено се користе HCl и NaOH. Подешавање pH вредности се врши на начин којим се неће у значајнијој мери променити концентрација испитиване супстанце. У извештају о испитивању навести уколико услед подешавања pH вредности дође до било какве хемијске реакције или преципитације испитиване супстанце.

1.6.1.2. Вода за гајење и разблаживање

За ову намену користи се питка вода (из извора који није загађен потенцијално штетним концентрацијама хлора, тешких метала или других супстанци), квалитетна природна вода или реконституисана вода (видети Део други ове методе). Укупна тврдоћа воде да буде између 10 mg/l $CaCO_3$ и 250 mg/l $CaCO_3$, а pH вредност између 6,0 и 8,5.

1.6.2. Опрема

Опрема за испитивање садржи:

- аутоматски систем за разблаживање (у испитивању са проточним системом);

- оксиметар;

- инструмент за одређивање тврдоће воде;

- одговарајућу апаратуру за контролу температуре;

- pH метар.

Сва опрема је израђена од хемијски инертног материјала.

1.6.3. Рибе

Рибе које се користе у испитивању су здраве и без видљивих деформација.

Врста рибе се бира на основу практичних критеријума: доступност врсте у току читаве године, једноставност одржавања, прикладност за обављање испитивања, релативна осетљивост на хемикалије итд. Узимају се у обзир економски, биолошки и еколошки фактори који могу да утичу на коначан исход испитивања. Код избора прикладне врсте риба узети у обзир и могућност поређења резултата и усклађеност између различитих лабораторија у свету (видети у литератури[1]).

Списак врста риба које се препоручују за испитивање дат је у Делу трећем ове методе. Најчешће се користе зебрица и калифорнијска пастрмка.

1.6.3.1. Чување

Рибе су из истог легла, а јединке, ако је могуће, сличне величине и старости. Риба се најмање 12 дана држи под следећим условима:

3) увођење риба:

- сходно систему у ком се врши испитивање (рециркулацијски или проточни) и врсти рибе;

4) вода:

- видети одељак 1.6.1.2. ове методе;

5) светлост:

- 12 до 16 сати осветљења дневно;

6) концентрације растворeног кисеоника:

- најмање 80% засићења;

7) исхрана:

- три пута недељно или једном дневно, са паузом од 24 сата пре почетка испитивања.

1.6.3.2. Смртност

Након периода стабилизације од 48 сати, бележи се смртност риба применом следећих критеријума:

1) ако је смртност у првих 7 дана виша од 10% укупне популације, читава популација се одбацује;

2) ако је смртност између 5% и 10% укупне популације, популација се чува додатних 7 дана. Ако не дође до додатних угинућа, популација се прихвата, у супротном, ако се забележи још које угинуће, популација се одбацује;

3) ако је смртност нижа од 5% укупне популације, популација се прихвата.

1.6.4. Адаптација

Вода у којој се гаје рибе и вода која се користи у испитивању имају исти квалитет и температурни режим и то најмање

седам дана пре почетка испитивања.

1.6.5. Поступак испитивања

У прелиминарном испитивању одређује се тачан опсег концентрација за испитивање.

Заједно са читавом серијом испитиваних концентрација, користи се и једна контрола у коју се не додаје испитивана супстанца, а по потреби и једна контрола са помоћном супстанцом.

У зависности од хемијских и физичких својстава испитиване супстанце, бира се одговарајући систем за испитивање: статички, полустатички или проточни, како би се задржали критеријуми квалитета.

Рибе се излажу испитиваној супстанци на следећи начин:

1) излагање траје 96 сати;

2) најмање по 7 јединки риба за сваку испитивану концентрацију;

3) коморе за испитивање су одговарајуће запремине за задати насад;

4) насад:

- максимални насад је 1 g/l за статични и полустатични систем, а за проточни систем насад може бити и већи;

5) испитиване концентрације:

- најмање пет концентрација које се разликују за фактор не већи од 2,2 и одабраних тако да покривају читав опсег смртности од 0% до 100%;

6) вода:

- видети одељак 1.6.1.2. ове методе;

7) светлост:

- 12 до 16 сати осветљења дневно;

8) температура:

- је одговарајућа за врсту (видети Део трећи ове методе), али унутар ± 1° C за било који систем за испитивање;

9) концентрације растворeног кисеоника:

- не мања од 60% засићења при одабраној температури;

10) исхрана:

- храна се не даје.

Рибе се проверавају након прва 2 до 4 сата, а касније у интервалима од 24 сата. Рибе се сматрају мртвим, ако додиривањем уске површине испред леђног пераја не дође до било какве реакције и ако се не виде покрети дисања. Мртве рибе се уклањају одмах по опажању, а смртност се стално бележи. Бележе се и видљиве абнормалности (нпр. губитак равнотеже, промене у начину пливања, поремећај респираторних функција, пигментације и сл).

Свакодневно се мере pH вредност, концентрација растворeног кисеоника и температура.

Гранично испитивање

Уз помоћ поступака описаних у овој методи може се извести гранично испитивање са концентрацијом од 100 mg/l, како би се показало да је LC_{50} већа од ове концентрације.

Ако је природа супстанце таква да се не може постићи концентрација од 100 mg/l, гранично испитивање се изводи са концентрацијом која је једнака растворљивости супстанце (или са максималном концентрацијом која формира стабилну дисперзију) у медијуму (видети одељак 1.6.1.1. ове методе).

Гранично испитивање се изводи са 7 до 10 риба и са истим бројем риба у контроли. (На основу биномне теореме предвиђа се да је у групи од 10 риба са нултом стопом смртности, са 99,9% интервалом поверења, вредност LC_{50} виша од концентрације која се користила у граничном испитивању. Ако у групи од 7, 8 или 9 риба нема смртности, тада је најмање са 99% интервалом поверења, LC_{50} виша од концентрације која се користила).

Ако дође до угинућа, изводи се потпуно испитивање. Бележе се и сублетални ефекти.

2. ПОДАЦИ И ПРОЦЕНА

За сваки временски интервал у ком се бележе опажања (након 24, 48, 72 и 96 сати), на логаритамском папиру графички се представља проценат смртности у функцији концентрације, за свако препоручено време излагања.

Применом стандардних поступака, када је то могуће, за сваки временски интервал опажања одређује се вредност LC_{50}и

интервал поверања (p = 0,05). Ове вредности се заокружују на једну или највише две децимале.

У случајевима када је нагиб криве концентрација/проценат превелик да би омогућио тачно израчунавање вредности LC_{50}, довољно је графички проценити вредности.

Када две узастопне концентрације, у опсегу фактора 2,2 дају само 0% или 100% смртност, ове две вредности довољне су за одређивање опсега у ком ће се наћи вредности LC_{50}.

Ако се установи да се стабилност или хомогеност испитиване супстанце не може одржавати, ово се опажање бележи са посебним освртом на ту чињеницу код тумачења резултата.

3. ИЗВЕШТАЈ

Извештај, ако је могуће, садржи следеће податке:

- врста рибе која се испитује (латински назив врсте, сој, добављач, претходни третман, величина и број риба за сваку испитивану концентрацију супстанце);

- порекло воде за разблаживање и њена основна хемијска својства (pH, тврдоћа, температура);

- поступак припреме основног раствора и испитиваних концентрација(у случају супстанци које имају ниску растворљивост у води);

- концентрација сваке помоћне супстанце;

- списак свих испитиваних концентрација и сведоступне информације о стабилности испитиване супстанце у раствору;

- опис коришћених метода и добијених резултата (у случају хемијске анализе);

- резултати граничног испитивања (у случају да је изведено);

- разлози избора и детаљи о коришћеном систему за испитивање (нпр. статични, полустатични, проточни, да ли се врши аерација, начин увођења риба, итд);

- опис опреме коришћене у испитивању;

- режим осветљења;

- концентрације растворeног кисеоника, pH вредност и температура испитиваних раствора на сваких 24 сата;

- докази да су испуњени критеријуми квалитета;

- таблица која показује укупну смртност при свакој концентрацији испитиване супстанце и контроле (заједно са контролом помоћне супстанце, ако је потребно) на крају сваког временског интервала;

- крива дозне зависности процента смртности од испитиване концентрације на крају испитивања;

- ако је могуће, вредности LC_{50} на крају сваког временског интервала (са 95% интервалом поверења);

- статистичке методе коришћене за одређивање LC_{50} вредности;

- (у случају да је коришћена референтна супстанца)упоредни резултати испитивања;

- највиша испитивана концентрација која није довела до угинућа рибе за време трајања испитивања;

- најнижа испитивана тест концентрација која је довела до 100% смртности за време трајање испитивања.

4. ЛИТЕРАТУРА

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. Eidgenössisches Department des Innern, Schweiz: Richtlinien fur Probenahme und Normung von Wasseruntersuchungsmethoden -Part II 1974.

6. DIN Testverfahren mit Wasserorganismen, 38 412 (11) und 1 (15).

7. JIS K 0102, Acute toxicity test for fish.

8. NEN 6506- Water -Bepaling van de akute toxiciteit met behulp van *Poecilia reticulata*, 1980.

9. Environmental Protection Agency, Methods for the acute toxicity tests with fish, macroinvertebrates and amphibians. The Committee on Methods for Toxicity Tests with Aquatic Organisms, Ecological Research Series EPA-660-75-009, 1975.

10. Environmental Protection Agency, Environmental monitoring and support laboratory, Office of Research and Development, EPA-600/4-78-012, January 1978.

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-AWWAWPCF, 1975.

13. Commission of the European Communities, Inter-laboratory test programme concerning the study of the ecotoxicityof a chemical substance with respect to the fish. EEC Study D.8368, 22 March 1979.

14. Verfahrensvorschlag des Umweltbundesamtes zum akuten Fisch-Test. Rudolph, P. und Boje, R. Okotoxikologie, Grundlagen fur die okotoxikologische Bewertung von Umweltchemikalien nach dem Chemikaliengesetz, ecomed 1986.

15. Litchfield, J. T.and Wilcoxon, F., A simplified method for evaluating dose effects experiments, J. Pharm, tExp. Therap., 1949, vol. 96,99.

16. Finney, D.J. Statistical Methods in Biological Assay. Griffin, Weycombe, U.K., 1978.

17. Sprague, J.B. Measurement of pollutant toxicity to fish. Bioassay methods for acute toxicity. Water Res., 1969, vol. 3,793-821.

18. Sprague, J.B. Measurement of pollutant toxicity to fish. II Utilising and applying bioassay results. Water Res. 1970, vol. 4, 3-32.

19. Stephan, C.E. Methods for calculating an LC_{50}. In Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (edited by F.I. Mayer and J.L. Hamelink). American Society for Testing and Materials, ASTM STP 634,1977, 65-84.

20. Stephan, C.E., Busch, K.A., Smith, R., Burke, J. and Andrews, R.W. A computer program for calculating an LC_{50}. US EPA.

Део други
РЕКОНСТИТУИСАНА ВОДА

Пример прикладног извора воде за разблаживање

Све хемикалије су аналитичке чистоће.

Вода је квалитетна дестилована вода или дејонизована вода са електричном проводљивошћу мањом од 5 mS/cm.

Опрема за дестилацију воде не сме да садржи бакарне делове.

Основни раствори

Растворити 11,76 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (калцијум-хлорид дихидрат) и допунити водом до запремине од 1 L.

Растворити 4,93 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (магнезијум-сулфат хептахидрат) и допунити водом до запремине од 1 L.

Растворити 2,59 g $NaHCO_3$ (натријум-хидрогенкарбонат) и допунити водом до запремине од 1 L.

Растворити 0,23 g KCl (калијум-хлорид) и допунити водом до запремине од 1 L.

Реконституисана вода за разблаживање

Помешати по 25 ml сваког основног раствора и допунити водом до запремине од 1 L. Аерисати све док се концентрација растворeног кисеоника не изједначи са концентрацијом кисеоника у засићеном ваздуху.

Вредност pH подесити на 7,8 ± 0,2.

Ако је потребно, pH се подешава додавањем NaOH (натријум хидроксида) или HCl (хлороводоничне киселине).

Овако припремљена вода за разблаживање остави се да стоји око 12 сати и даље се не аерише.

Збир Ca и Mg јона у овом раствору износи 2,5 mol/l. Однос Ca и Mg јона износи 4:1, а Na и K јона износи 10:1. Укупан алкалитет раствора износи 0,8 mmol/l.

Измене у поступку припреме воде за разблаживање не смеју да утичу на састав или својства воде.

Део трећи
ВРСТЕ РИБА КОЈЕ СЕ ПРЕПОРУЧУЈУ ЗА ИСПИТИВАЊЕ

Препоручена врста	Препоручени температурни	Препоручена укупна дужина тест

	опсег (°C)	јединке (cm)
Brachydanio rerio(Teleostei, Cyprinidae) (Hamilton -Buchanan), зебрица	20 до 24	3,0 ± 0,5
Pimephales promelas (Teleostei, Cyprinidae) (Rafinesque)	20 до 24	5,0 ± 2,5
Cyprinus carpio(Teleostei, Cyprinidae) (Linneaus 1758), шаран	20 до 24	6,0 ± 2,0
Oryzias latipes (Teleostei, Poeciliidae) Cyprinodontidae (Tomminck and Schlege 1850)	20 до 24	3,0 ± 1,0
Poecilia reticulata(Teleostei, Poeciliidae) (Peters 1859), гупи	20 до 24	3,0 ± 1,0
Lepomis macrochirus (Teleostei, Centrarchidae) (Rafinesque Linneaus 1758)	20 до 24	5,0 ± 2,0
Onchorhynchus mykiss (Teleostei, Salmonidae)(Walbaum 1988), калифорнијска пастрмка	12 до 17	6,0 ± 2,0
Leuciscus idus (Teleostei, Cyprinidae) (Linneaus 1758), јаз	20 до 24	6,0 ± 2,0

НАБАВЉАЊЕ РИБА

Наведене врсте риба лако се размножавају и узгајају. У многим деловима света ове врсте риба могу се набавити у току целе године. Како су наведене врсте погодне и за узгајање у лабораторијским условима, здравствено стање и порекло јединки које се користе за испитивање је, уз контролу присуства паразита и болести, увек познато.

Део четврти

ПРИМЕР ЗАВИСНОСТИ КОНЦЕНТРАЦИЈЕ ОД ПРОЦЕНТА СМРТНОСТИ

Пример одређивања LC_{50} уз помоћ логаритамског папира

C.2. МЕТОДА ИСПИТИВАЊА АКУТНЕ ТОКСИЧНОСТИ: ИМОБИЛИЗАЦИЈА *Daphnia sp.*

Део први

1. МЕТОДА ИСПИТИВАЊА

Метода се заснива на Упутству за испитивање OECD 202 (2004).

1.1. УВОД

Метода описује испитивање акутне токсичности које служи за процену ефекта супстанци на дафније. Постојеће методе испитивања коришћене су у највећој могућој мери[1, 2, 3].

1.2. ДЕФИНИЦИЈЕ

Поједини изрази употребљени у овој методи испитивања имају следеће значење:

Ефективна концентрација (EC_{50}) јесте концентрација супстанце за коју је процењено да доводи до имобилизације 50% јединки популације које су изложене дејству супстанце у току унапред дефинисаног периода. Дозвољено је коришћење друге дефиниције уз објашњење и навођење литературе.

Имобилисане животиње јесу животиње које не запливају 15 секунди након што је раствор у посуди за испитивање лагано узбуркан (чак и у случају да и даље покрећу антене).

1.3. ПРИНЦИП МЕТОДЕ

Младе дафније (неонате), старости до 24 сата на почетку испитивања, непрекидно се излажу испитиваној супстанци у серији концентрација у току 48 сати. Број имобилисаних јединки бележи сена свака 24 и 48 сати, а вредности се пореде са вредностима у контролној групи. Анализом резултата израчунава се EC_{50} након 48 сата (видети дефиниције из одељка 1.2. ове методе). Израчунавање EC_{50} након 24 сата није обавезно.

1.4. ПОДАЦИ О ИСПИТИВАНОЈ СУПСТАНЦИ

Потребно је имати податке о растворљивости у води и напону паре испитиване супстанце. Треба да буде доступна и поуздана аналитичка метода за квантификацију супстанце у испитиваном раствору са подацима о ефикасности и границама детекције. Од користи су и подаци о структурној формули, чистоћи супстанце, стабилности у води и на светлу, коефицијент расподеле у систему *n*-октанол/вода (P_{ow}) и резултати испитивања биоразградљивости (видети методу C.4. која је дата у овом прилогу).

Напомена: Смернице за извођење испитивања на супстанцама са физичким и хемијским својствима која их чине тешким за испитивање могу се наћи у упутству[4].

1.5. РЕФЕРЕНТНЕ СУПСТАНЦЕ

Ефективна концентрација (EC_{50}) референтне супстанце одређује се да би се потврдила поузданост услова испитивања. За ову намену препоручује се употреба токсичних супстанци[I] које су коришћене у међулабораторијским испитивањима[1, 5]. Испитивања са референтном супстанцом изводе се једном месечно, а најмање два пута годишње.

_____

I На основу резултата међулабораторијских испитивања и Техничке исправке ISO 6341 стандарда, опсег EC_{50} за калијум-дихромат ($K_2Cr_2O_7$) износи 0,6 mg/l до 1,7 mg/l.

1.6. КРИТЕРИЈУМИ КВАЛИТЕТА

Да би испитивање било прихваћено, испуњавају се следећи критеријуми квалитета:

У посудама за испитивање у којима су контролне групе (укључујући и групе које садрже растварач), проценат имобилисаних дафнија на крају испитивања не сме бити већи од 10%.

У посудама за испитивање, укључујући и посуде у којима су контролне групе, концентрација растворeног кисеоника на крају испитивања је ≥ 3 mg/l.

Напомена: Да би се задовољио први критеријум, у контролним групама проценат имобилисаних дафнија не сме бити већи од 10%. Поред тога, не сме бити више од 10% јединки које показују било какве знаке болести или стреса, попутгубљења боје, или неко друго несвојствено понашање.

1.7. ОПИС МЕТОДЕ

1.7.1. Опрема

Посуде за испитивање и остала опрема која долази у додир са испитиваним раствором су од стакла или неког другог хемијски

инертног материјала. Најчешће се као посуде за испитивање користе епрувете или чаше. Пре сваке употребе посуде се перу стандардним поступком за прање лабораторијског посуђа. Испаравање воде и упадање прашине у раствор током испитивања, предупредити поклопањем посуда, али тако да поклопац не пријања у потпуности. Лако испарљиве супстанце испитују се у добро затвореним посудама, које су напуњене до врха испитиваним раствором, довољно велике запремине да се избегне да кисеоник недостаје или пад концентрације растворeног кисеоника испод критеријума квалитета (видети одељак 1.6. и први пасус одељка 1.8.3. ове методе).

Неопходна је и следећа опрема (сва или само поједини апарати):

– оксиметар (са микрокисеоничном електродом или нека друга опрема погодна за мерење концентрације кисеоника у малој запремини узорка);

– pH метар;

– погодна опрема за контролу температуре;

– опрема за одређивање концентрације укупног органског угљеника (у даљем тексту: ТОС);

– опрема за одређивање хемијске потрошње кисеоника (у даљем тексту: ХПК);

– опрема за одређивање тврдоће воде, итд.

1.7.2. Испитивани организам

За испитивање се користи врста *Daphnia magna*Straus, а погодне су и остале врсте рода *Daphnia* (нпр. *Dapxnia pylex*). На почетку испитивања, јединке (неонате) морају бити млађе од 24 сата, а да би се смањила варијабилност, изричито се препоручује да се не узимају из првог легла адулта. Порекло јединки је из здравог легла (у ком јединке не показују било какве знаке стреса попут високе смртности, присуства мужјака, појаве омотача (ephippia), кашњења у добијању легла, обезбојене јединке, итд.). Све јединке које се користе у конкретном испитивању да потичу из легла које је установљено из једног матичног легла. Матична легла се гаје у условима који су у погледу светлосног и температурног режима и медијума слични оним у току испитивања. У случају да је медијум за гајење дафнија другачији од оног који се користи у испитивању, уводи се аклиматизациони период. Адултне јединке, од којих ће се добити неонате које се користе у испитивању, пребацују се у медијум за разблаживање најмање 48 сати пре почетка испитивања и држе, до самог почетка испитивања, на температури на којој ће се изводити испитивање.

1.7.3. Вода за гајење и разблаживање

Природна вода (површинска или подземна), реконституисана вода или дехлорисана водоводна вода представљају погодну воду за гајење дафнија и воду за разблаживање испитиваног раствора, под условом да дафније у њима преживљавају у току узгоја, аклиматизационог периода и у току испитивања, не показујући знаке стреса. Било која вода која задовољава својства прихватљиве воде за разблаживање (видети Део други ове методе) погодна је за испитивање. Квалитет воде је уједначен у току целог испитивања. Реконституисана вода се припрема тако што се у дејонизовану или дестиловану воду додаје тачна количина потребних састојака познате аналитичке чистоће. Примери реконституисане воде могу се наћи у литератури[1, 6] и у Делу трећем ове методе. Важно је напоменути да медијуме који садрже хелатизирајуће супстанце, попут медијума М4 и М7 (видети Део трећи ове методе), не користити када се испитују супстанце које садрже метале. Вредност pH да буде у опсегу од 6 до 9. За испитивање са врстом *Daphnia magna*препоручује се тврдоћа воде од 140 mg/l$CaCO_3$ до 250 mg/l$CaCO_3$, док је за друге врсте рода *Daphnia* погоднија нижа тврдоћа воде. Вода за разблаживање се аерише пре коришћења у испитивању, да би концентрација раствореног кисеоника достигла засићење.

Ако се користи природна вода, параметре квалитета мерити најмање два пута годишње или кад год се посумња да је дошло до значајних промена карактеристика (видети претходни пасус и Део други ове методе). Треба измерити и садржај тешких метала (нпр. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni). Ако се користи дехлорисана водоводна вода, пожељно је свакодневно мерити садржај хлора. Ако се користи површинска или подземна вода, измерити електропроводљивост и ТОС или ХПК.

1.7.4. Испитивани раствори

Испитивани раствори изабраних концентрација најчешће се праве разблаживањем основног раствора. Због тога се основни раствор добија директним растварањем испитиване супстанце у води за разблаживање. Треба, у највећој могућој мери, избегавати употребу растварача, емулзификатора и дисперезионих средстава. У неким случајевима ове помоћне супстанце су неопходне како би се успешно направио концентровани основни раствор. Употреба растварача, емулзификатора и дисперзионих средстава описана је у литератури[4]. Концентрација испитиване супстанце у раствору не сме да пређе границу растворљивости супстанце у води за разблаживање.

Испитивање извести без подешавања pH вредности. Ако дође да значајније промене pH вредности, препоручује се понављање испитивања уз подешавање pH вредности на вредност коју је вода за разблаживање имала пре растварања испитиване супстанце. Подешавање pH вредности изводи се тако да се концентрација испитиване супстанце у основном раствору значајније не промени, као и да се избегне било каква хемијска реакција или преципитација испитиване супстанце. За подешавање pH вредности углавном се користе раствори HCl и NaOH.

1.8. ПОСТУПАК

1.8.1. Услови

1.8.1.1. Испитиване и контролне групе

Посуде за испитивање пуне се одговарајућим запреминама воде за разблаживање и испитиваним растворима. Запремински однос ваздух/вода да буде једнак у свим испитиваним и контролним групама. Након тога се дафније уносе у посуде за испитивање. У испитивању се за сваку концентрацију, као и контролну групу, користи најмање по 20 јединки, подељених у 4 групе (понављања) од по 5 јединки. Запремина раствора је довољна да обезбеди минимум 2 ml раствора по јединки, односно, минимална запремина по посуди за испитивање је 10 ml. Испитивање се одвија у полустатичним (уз комплетно периодично обнављање испитиваног раствора) или у проточним системима, ако концентрације испитиване супстанца нису стабилне.

У сваком испитивању, обавезно је поставити по једну контролну групу (4 посуде са по 5 јединки) искључиво са водом коришћеном за разблаживање. Уколико је коришћена и помоћна супстанца при прављењу раствора, поставља се и додатна контролна група са помоћном супстанцом растворeном у води за разблаживање.

1.8.1.2. Одређивање концентрације

Када нису доступни подаци о токсичности испитиване супстанце, а у циљу одређивања опсега испитиваних концентрација, изводи се прелиминарно испитивање. Прелиминарно испитивање се изводи у широком опсегу концентрација испитиване супстанце, па је довољно поставити по 5 јединки по контролној и испитиваној групи (без понављања). Дужина прелиминарног испитивања може бити 48 сати, али ако се потребни подаци добију у краћем року, испитивање се може прекинути након 24 сата.

Прелиминарно испитивање се поставља у 5 испитиваних концентрација, у геометријској серији са фактором од минимум 2,2. Образложење је неопходно ако се користи мање од 5 различитих испитиваних концентрација. У прелиминарном огледу, излагање дафнија највишој примењеној концентрација потребно је да доведе до 100% имобилизације, док излагање најнижој изабраној концентрацији не треба да доведе до значајнијег одговора.

1.8.1.3. Услови у току испитивања

Температура на којој се изводе испитивања за процену акутне токсичности да буде у опсегу од 18º C до 22º C, а у току једног испитивања акутне токсичности, изабрана температура не варира више од ± 1º C. Препоручује се светлосни режим од 16 сати светла и 8 сати мрака, али је код фотонестабилних супстанци дозвољено да се цело испитивање изведе у мраку.

У току испитивања, није дозвољена аерација раствора у посудама. Испитивање извести без подешавања pH вредности. Животиње се не хране у току трајања испитивања.

1.8.1.4. Дужина испитивања

Испитивање траје 48 сати.

1.8.2. Посматрани одговор

Свака посуда се проверава након 24 и 48 сати од почетка испитивања (видети дефиниције из одељка 1.2. ове методе). Поред имобилизације јединки, прати се и бележи свако неуобичајено понашање или појава.

1.8.3. Мерења

Концентрација растворeног кисеоника и pH вредност мере се на почетку и на крају испитивања у контролној и у испитиваној групи у којој је примењена највиша концентрација испитиване супстанце. Концентрација растворeног кисеоника у контролним групама испуњава критеријуме квалитета (видети одељак 1.6. ове методе). Ни у једном испитивању pH вредност не варира за више од 1,5. Температура се обично прати у посудама из контролних група или у просторији у којој је постављен оглед. Препорука је да се температура непрекидно прати, а најмање на почетку и на крају испитивања.

Концентрације супстанце измерити у групама са најнижом и највишом концентрацијом, на почетку и на крају испитивања[4]. Препоручује се да се резултати тумаче на основу измерених концентрација. Ако се докаже да се концентрација испитиване супстанце не мења у односу на номиналну или почетно измерену за више од ± 20%, резултати се могу исказати на основу номиналних или почетно измерених вредности.

1.9. ГРАНИЧНА СТУДИЈА

Уз помоћ поступака описаних у овој методи, може се извести гранична студија са концентрацијом испитиване супстанце од 100 mg/l или са вредношћу концентрације растворљивости супстанце у медијуму (увек се бира нижа од ове две вредности) како би се показало да је LC_{50} виша од ове концентрације. Гранична студија се изводи са 20 јединки дафније, подељених у 4 групе од по 5 јединки по посуди и са истим бројем и распоредом јединки у контролној групи. Ако дође до имобилизације јединки у испитиваној групи, обавезно се изводи потпуно испитивање. Бележи се свако неуобичајено понашање јединки.

2. ПОДАЦИ

Сви подаци добијени испитивањем акутне токсичности наводе се табеларно. За сваку испитивану и контролну групу наводи се број јединки на почетку испитивања и број имобилисаних јединки за сваки посматрани интервал.

Проценат имобилисаних јединки након 24 и 48 сати графички се приказује у функцији испитиваних концентрација. Подаци се анализирају примереном статистичком методом (нпр. пробит анализа), израчунава се нагиб криве и EC_{50} са 95% интервалима поверења (p = 0,05).

Уколико за добијене резултате стандардне методе за израчунавање EC_{50} нису примењиве, за апроксимацију EC_{50} узима се геометријска средина између две испитиване концентрације – највише испитиване концентрације која није довела до имобилизације и најниже испитиване концентрације која је довела до имобилизације 100% јединки у испитиваној групи.

3. ИЗВЕШТАЈ

Извештај о испитивању садржи податке о:

1) испитиваној супстанци:

– физичка и најважнија физичка и хемијска својства;

– подаци о хемијским својствима, укључујући чистоћу супстанце;

2) испитиваној врсти:

– подаци о пореклу и врсти дафнија, добављач (ако је познат), услови лабораторијског гајења културе (укључујући порекло, количине и врсту хране, динамику исхране);

3) условима у току испитивања:

– опис посуда: тип посуде, запремина раствора, број јединки по посуди, број посуда по испитиваној концентрацији (групи);

– начин припреме основног и испитиваног раствор, укључујући и податке о употреби помоћне супстанце (врста и концентрације);

– опис воде коришћене за разблаживање; порекло и основне својства (pH, тврдоћа, однос Ca/Mg, однос Na/K, алкалитет, електропроводљивост), састав реконституисане воде (ако је коришћена);

– услови инкубације: температура, интензитет светла и светлосни режим, концентрација кисеоника, pH вредност, итд;

4) резултатима:

– број и проценат имобилисаних јединки или јединки које су показале знаке стреса (укључујући атипично понашање) у контролним и свим испитиваним групама, у тренутку посматрања, као и опис уоченог одговора;

– резултате и датум испитивања са референтом супстанцом, ако су доступни;

– номиналне концентрације испитиване супстанце и резултате свих мерења концентрације испитиване супстанце у посудама, ефикасност аналитичке методе коришћене за мерења и границе детекције;

– резултате свих мерења основних физичко-хемијских параметара у току испитивања (pH, концентрација раствореног кисеоника);

– вредност EC_{50} након 48 сати за имобилизацију као посматрани параметар са интервалом поверења и графички приказ регресионог модела коришћеног за израчунавање EC_{50} вредности; нагиб криве дозне зависности и стандардна грешка, статистичке методе коришћене за израчунавање EC_{50} вредности (ови подаци се прилажу и уколико су израчунати за резултате добијене након периода од 24 сата);

– објашњење за свако одступање од методе и да ли је одступање утицало на резултате испитивања.

4. ЛИТЕРАТУРА

1. ISO 6341. (1996). Water quality – Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) – Acute toxicity test. Third edition, 1996.

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. 3rd ed. London. Griffin, Weycombe, UK.

Део други

ХЕМИЈСКА СВОЈСТВА ПРИХВАТЉИВЕ ВОДЕ ЗА РАЗБЛАЖИВАЊЕ

Супстанца	Концентрација
Суспендоване материје	< 20 mg/l
Укупни органски угљеник	< 2 mg/l
Нејонизован амонијак	< 1 µg/l
Резидуални хлор	< 10 µg/l

Укупни органофосфорни пестициди	< 50 ng/l
Укупни органохлорни пестициди плус полихлоровани бифенили	< 50 ng/l
Укупни органски хлор	< 25 ng/l

Део трећи
ПРИМЕРИ РЕКОНСТИТУИСАНЕ ВОДЕ ISO ВОДА ЗА ИСПИТИВАЊЕ[1]

Основни раствори (појединачне супстанце)		Запремине основних раствора које додати и допунити до 1 L воде[II] ради припреме реконституисане воде
Супстанца	Конц. супстанце у води[II]	
Калцијум-хлорид $CaCl_2 \cdot 2H_2O$	11,76 g/l	25 ml
Магнезијум-сулфат $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	4,93 g/l	25 ml
Натријум-бикарбонат $NaHCO_3$	2,59 g/l	25 ml
Калцијум-хлорид KCl	0,23 g/l	25 ml

_____

II Вода прихватљиве чистоће, нпр. дејонизована, дестилована или вода добијена реверзном осмозом, са електричном проводљивошћу испод 10 µS/cm

ЕЛАНДТ М4 И М7 МЕДИЈУМ

Адаптација на Еландт М4 и М7 медијум

Лабораторије су имале потешкоће код директног пребацивања дафнија у Еландт М4 и М7 медијум. Бољи успех се постиже постепеном аклиматизацијом, на пример премештање дафнија из сопственог у 30% Еландт, па у 60% Еландт па тек онда у 100% Еландт. Може бити потребно и до месец дана аклиматизационог периода.

Припрема

Микронутријенти

Посебни основни раствори (I) појединих микронутријената припремају се коришћењем воде прихватљиве чистоће, нпр. дејонизоване, дестиловане или воде добијене реверзном осмозом. Од овако припремљених основних раствора, прави се следећи основни раствор (II), који садржи све потребне микроелементе.

Основни раствор (I): микронутријенти (појединачне супстанце)	Количина која се додаје у воду (mg/l)	Концентрација (у односу на М4)	За припрему комбинованог основног раствора (II), додати следеће запремине основних раствора (I) и допунити до 1L воде*	
			М4	М7
H_3BO_3	57.190	20.000 пута	1	0,25
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	7.210	20.000 пута	1	0,25
LiCl	6.120	20.000 пута	1	0,25
RbCl	1.420	20.000 пута	1	0,25

$SrCl_2 \cdot 6H_2O$	3.040	20.000 пута	1	0,25
NaBr	320	20.000 пута	1	0,25
$Na_2MoO_2 \cdot 2H_2O$	1.260	20.000 пута	1	0,25
$CuCl_2$	335	20.000 пута	1	0,25
$ZnCl_2$	260	20.000 пута	1	1
$CoCl_2 x 6H_2O$	200	20.000 пута	1	1
KJ	65	20.000 пута	1	1
Na_2SeO_3	43,8	20.000 пута	1	1
NH_4VO_3	11,5	20.000 пута	1	1
$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	5.000	2.000 пута	-	-
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	1.991	2.000 пута	-	-

Na_2EDTA и $FeSO_4$ припремају се појединачно, помешају и одмах аутоклавирају, што чини:

2 L раствора Fe – EDTA		1.000 пута	20	5

Припрема Еландт М4 и М7 медијума

М4 и М7 медијуми припремају се коришћењем основног раствора (II), макронутријената и витамина, на следећи начин:

	Количина која се додаје у воду (mg/l)	Концентрација (у односу на М4)	Количина основног раствора (II) која се додаје при припреми медијума (mg/l)	
			М4	М7
Основни раствор (II) (комбиновани микронутријенти)		20 пута	50	50
Основни раствори макронутријената (појединачне супстанце)				
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	293.800	1.000 пута	1,0	1,0
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	246.600	2.000 пута	0,5	0,5
KCl	58.000	10.000 пута	0,1	0,1
$NaHCO_3$	64.800	1.000 пута	1,0	1,0
$Na_2SiO_3 \cdot 9H_2O$	50.000	5.000 пута	0,2	0,2
$NaNO_3$	2.740	10.000 пута	0,1	1,0
KH_2PO_4	1.430	10.000 пута	0,1	1,0
K_2HPO_4	1.840	10.000 пута	0,1	1,0
Комбиновани витамински раствор			0,1	0,1

Комбиновани витамински раствор припрема се тако што се 3 витамина додају у воду на следећи начин:

Тиамин-хидрохлорид	750	10.000 пута		
Цианокобаламин (Б12)	10	10.000 пута		
Биотин	7,5	10.000 пута		

Комбиновани витамински раствор се чува у замрзивачу, у малим порцијама. Витамински раствор се додаје у медијум непосредно пре употребе.

Напомена: Да се избегне таложење соли при припреми медијума, поједини раствори се разблажују у 500 ml до800 ml дејонизоване воде и допуне до 1 L.

Напомена: Рецептура за M4 је први пут објављена у „Elendt, B. P. (1990). Selenium deficiency in crustacea; an ultrastructual approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. Protoplasma, 154, 25-33".

C.3. ИСПИТИВАЊЕ ИНХИБИЦИЈЕ РАСТА СЛАТКОВОДНИХ АЛГИ И ЦИЈАНОБАКТЕРИЈА

Део први

1. МЕТОДА ИСПИТИВАЊА

Ова метода заснива се на Упутству за испитивање OECD 201 (2006)[1].

1.1. УВОД

Методе испитивања се периодично преиспитују и ажурирају у циљу научног напретка. Методу испитивања C.3. било је потребно ревидирати како би се укључиле додатне врсте и испунили захтеви процене опасности и класификације хемикалија. Ревизија је обављена на основу широког практичног искуства, научног напретка у области токсиколошких истраживања на алгама и широке регулаторне примене која је уследила након њеног доношења.

1.2. ДЕФИНИЦИЈЕ

Поједини изрази употребљени у овој методи испитивања имају следеће значење:

Биомаса јесте сува маса живе материје садржане у популацији изражена у односу на дату запремину; нпр. mg алги/l раствора за испитивање. Биомаса се обично дефинише као маса, али се у овом испитивању ова реч односи на масу по запремини. У овом испитивању се по правилу мере и алтернативни параметри за биомасу, као што је број ћелија, флуоресценција итд, па се израз биомаса односи и на те алтернативе мере.

Коефицијент варијације јесте бездимензионална мера варијабилности параметра, дефинисана као однос стандардне девијације и средње вредности. Ова вредност може бити изражена и у процентима. Средњи коефицијент варијације просечне специфичне брзине раста у понављањима контролних култура израчунава се на следећи начин:

1. Израчуна се коефицијент варијације (у даљем тексту: CV) просечне специфичне брзине раста из дневних/етапних брзина раста за одговарајуће понављање и изрази у процентима.

2. Израчуна се средња вредност свих израчунатих вредности из тачке 1. како би се добио средњи коефицијент варијације дневне/етапне специфичне брзине раста у понављањима контролних култура.

EC_x јесте концентрација испитиване супстанце растворене у подлози за испитивање која резултира x%-тним (нпр. 50%) смањењем раста испитиваног организма у оквиру наведеног периода излагања (које изричито навести ако одступа од пуног или уобичајеног трајања испитивања). Да се недвосмислено покаже да ли је вредност EC добијена из брзине раста (growth rate) или из прираста (yield) користе се симболи ErC и EyC.

Хранљива подлога јесте комплетна синтетичка подлога културе у којој испитиване алге расту кад се изложе испитиваној супстанци. Испитивана супстанца се по правилу раствара у подлози која се користи током испитивања.

Брзина раста (просечна специфична брзина раста) јесте логаритамско повећање биомасе у периоду излагања.

Најнижа концентрација са запаженим ефектом (у даљем тексту: LOEC) јесте најнижа испитивана концентрација код које је током одређеног периода излагања запажен статистички значајан негативни ефекат супстанце на раст (при $p < 0,05$) у поређењу са контролом. Све испитиване концентрације изнад LOEC имају једнак или већи штетан ефекат од онога који је забележен при LOEC. Ако се ова два услова не могу испунити, детаљно се објашњава како је одабран LOEC (а према томе и NOEC).

Највиша концентрација без запаженог ефекта (у даљем тексту: NOEC) јесте испитивана концентрација непосредно испод LOEC.

Променљива одговора јесте променљива за процену токсичности изведена из било којег мереног параметра који описује биомасу применом различитих метода израчунавања. Код ове методе брзина раста и прираста су променљиве одговора добијене директним мерењем биомасе или било којег наведеног заменског параметра.

Специфична брзина раста јесте променљива одговора дефинисана као количник разлике природних логаритама посматраног параметра (код ове методе испитивања, биомаса) и одговарајућег временског периода.

Прираст јесте вредност мерне променљиве на крају периода излагања умањена за вредност мерне променљиве на почетку периода излагања, којом се изражава повећање биомасе током испитивања.

1.3. ПРИМЕЊИВОСТ ИСПИТИВАЊА

Ова метода испитивања се најлакше примењује код супстанци растворљивих у води за које се може претпоставити да ће у условима испитивања остати у води. Када се испитују супстанце које су испарљиве, јако адсорптивне, обојене, слабо растворљиве у води и супстанце које могу утицати на расположивост хранљивих материја или минерала у подлози за испитивање, можда ће бити потребно да се описани поступак измени (нпр. затворени систем, кондиционирање судова за испитивање). Смернице за неке измене дате су у литератури[2,3,4].

1.4. ПРИНЦИП ИСПИТИВАЊА

Сврха испитивања је да се одреде ефекти супстанци на раст слатководних микроалги и/или цијанобактерија. Експоненцијално растући тест организми излажу се испитиваној супстанци у шаржним културама, по правилу током 72 сата. Иако испитивања релативно кратко трају могу се оценити ефекти у неколико генерација.

Одговор система састоји се у смањењу раста низа култура алги (испитиване јединице) које су изложене различитим концентрацијама испитиване супстанце. Одговор се оцењује као функција концентрације излагања у односу на просечни раст поновљених, неизложених контролних култура. Да би се у пуној мери изразио одговор система на токсичне ефекте (оптимална осетљивост), културама се оставља довољно времена да постигну неограничен експоненцијални раст, уз довољно хранљивих материја и непрекидно осветљење како би се измерило смањење специфичне брзине раста.

Раст и инхибиција раста квантификују се мерењима биомасе алги у зависности од времена. Биомаса алги дефинисана је као сува маса по запремини, нпр. mg алги/l раствора за испитивање. Суву масу је тешко мерити па се користе алтернативни параметри. Од ових алтернативних параметара најчешће се користи број ћелија. Остали алтернативни параметри су запремина ћелија, флуоресценција, оптичка густина, итд. Фактор конверзије између алтернативних параметара и биомасе да буде познат.

Праћени параметари испитивања су инхибиција раста, изражена као логаритамско повећање биомасе (просечна специфична брзина раста) у периоду излагања. Из просечних специфичних брзина раста забележених у серији испитиваних раствора одређује се концентрација која изазива одређено x%-тно смањење брзине раста (нпр. 50%), која се изражава као ErCx (нпр. ErC_{50}).

Да би ова метода испитивања могла да се примени, израчунавање резултата се заснива на просечној специфичној брзини раста из разлога наведених у одељку 2.2. ове методе. У овој методи испитивања користи се и додатни променљиви одговор, прираст, који је потребан да би се испунили одређени регулаторни захтеви у неким државама. Дефинише се као биомаса на крају периода излагања умањена за биомасу на почетку периода излагања. Из прираста забележеног у серији испитиваних раствора израчунава се концентрација која изазива одређено x%-тно смањење прираста (нпр. 50%), која се изражава као E_yC_x (нпр. E_yC_{50}).

Осим тога, може се статистички одредити најнижа концентрација са запаженим ефектом (LOEC) и највиша концентрација без запаженог ефекта (NOEC).

1.5. ИНФОРМАЦИЈЕ О ИСПИТИВАНОЈ СУПСТАНЦИ

Информације о испитиваној супстанци, које могу бити корисне за одређивање услова испитивања обухватају структурну формулу, чистоћу, стабилност на светлу, стабилност у условима испитивања, својства апсорпције светла, pKa и резултате истраживања конверзије, укључујући биоразградљивост у води.

Треба да буду познати растворљивост у води, коефицијент расподеле октанол/вода (P_{ow}) и напон паре испитиване супстанце, и да буде на располагању валидирана метода за квантификацију супстанце у растворима за испитивање са документованим искоришћењем и границом детекције.

1.6. РЕФЕРЕНТНА СУПСТАНЦА

Једна или више референтних супстанци као нпр. 3,5-дихлорфенол коришћен у међународном међулабораторијском испитивању[4], могу се користити за проверу поступка испитивања. Као референтна супстанца за зелене алге може се користити и калијум дихромат. Пожељно је да се референтна супстанца испитује најмање два пута годишње.

1.7. ВАЛИДНОСТ ИСПИТИВАЊА

Да би испитивање било валидно испуњавају се следећи критеријуми:

– Биомаса у контролним културама експоненцијално се повећава најмање за фактор 16 у периоду испитивања од 72 сата. То одговара специфичној брзини раста од 0,92 дана$^{-1}$. Код врста које се најчешће користе, брзина раста је обично знатно виша (видети Додатак први ове методе). Овај критеријум можда неће бити задовољен ако се користе врсте које расту спорије од оних које су наведене у Додатку 1. ове методе. У том случају период испитивања продужити колико је потребно да се у контролним културама добије најмање 16-струки раст, уз ескпоненцијални раст током целокупног периода испитивања. Период испитивања може се скратити на најмање 48 сати да би се одржао неограничени експоненцијални раст током испитивања, под условом да је постигнут минимални фактор повећања 16.

- Средњи коефицијент варијације етапних специфичних брзина раста (дан 0–1, 1–2 и 2–3, за испитивање које траје 72 сата) у контролним културама (видети одељак 1.2. коефицијент варијације) не сме бити виши од 35%. За израчунавање етапне специфичне брзине раста видети одељак 2.2.1. ове методе. Овај критеријум важи за средњу вредност коефицијената варијације израчунатих за понављања контролних култура.

– Код испитивања са врстама *Pseudokirchneriella subcapitata* и *Desmodesmus subspicatus* коефицијент варијације просечних специфичних брзина раста у понављањима са контролним културама током укупног периода испитивања не сме бити виши од 7%. Код осталих врста које се ређе испитују та вредност не сме бити виша од 10%.

1.8. ОПИС МЕТОДЕ

1.8.1. Апаратура

Судови за испитивање и остала апаратура која долази у додир са испитиваним растворима за испитивање у потпуности

су израђени од стакла или другог хемијски инертног материјала. Апаратуру темељно опрати како органски и неорганski загађивачи не би утицали на раст алги или на састав раствора за испитивање.

Посуде које се користе током испитивања ће по правилу бити стаклени судови довољних димензија да се осигура потребна запремина културе за мерења током испитивања и довољан пренос масе CO_2 из атмосфере (видети одељак 1.8.9. ове методе). Запремина течности треба да буде довољна за аналитичка одређивања (видети одељак 1.8.11. ове методе).

Потребна је следећа опрема, односно делови опреме:

– Инкубатор за гајење: препоручује се ормар или комора у којој се може одржавати одабрана температура инкубације у границама ± 2° C.

– Инструменти за мерење светла: важно је напоменути да метода која се користи за мерење интензитета светла, а нарочито врста пријемника (сензора), може утицати на мерну вредност. Мерења, ако је могуће, спроводити уз помоћ сферичног пријемника (4 π) (који реагује на директно и рефлектовано светло из свих углова изнад и испод мерне равни) или пријемника 2 π (који реагује на светло из свих углова изнад мерне равни).

– Апарат за одређивање биомасе алги. Број ћелија, најчешће коришћени алтернативни параметар за биомасу алги, може се одредити помоћу електронског бројача честица, микроскопа са комором за бројање или проточног цитометра. Остали се алтернативни параметри за биомасу могу се измерити помоћу проточног цитометра, флуориметра, спектрофотометра и колориметра. Корисно је израчунати фактор конверзије број ћелија – сува маса. Да би се код мерења спектрофотометром добиле корисне мерне вредности при ниским концентрацијама биомасе, понекад је потребно употребити кивете са дужином светлосног пута од најмање 4 cm.

1.8.2. Испитивани организми

Може се користити неколико врста слободно пливајућих микроалги и цијанобактерија. За сојеве наведене у Додатку 1. ове методе доказано је да су подесни за поступак испитивања из ове методе испитивања.

Ако се користе друге врсте, навести сој и/или порекло. Потребно је уверити се да се експоненцијални раст одабраних испитиваних алги може одржати у преовлађујућим условима испитивања током целокупног периода испитивања.

1.8.3. Хранљива подлога

Препоручују се две алтернативне хранљиве подлоге, OECD и AAP. Састав тих подлога приказан је у Додатку 2. ове методе. Треба напоменути да те две подлоге имају различиту почетну pH вредност и пуферски капацитет (за регулацију повећања pH вредности). Стога се код испитивања могу добити различити резултати у зависности од подлоге која се користи, нарочито кад се испитују јонизујуће супстанце.

У одређеним случајевима је потребно изменити хранљиве подлоге, нпр. кад се испитују метали и хелатна средства, или кад се испитивање спроводи са различитим pH вредностима. Коришћење измењене подлоге детаљно се описује и образлаже[3,4.]

1.8.4. Почетна концентрација биомасе

Почетна биомаса у испитиваним културама једнака је у свим испитиваним културама и довољно ниска да се може постићи експоненцијални раст током читавог периода инкубације без бојазни да би се могле исцрпити залихе хранљивих материја. Почетна биомаса не треба да буде виша од 0,5 mg/l суве масе. Препоручују се следеће почетне концентрације ћелија:

Pseudokirchneriella subcapitata 5×10^3-10^4 ћелија/ml

Desmodesmus subspicatus 2-5 $\times 10^3$ ћелија/ml

Navicula pelliculosa 10^4 ћелија/ml

Anabaena flos-aquae 10^4 ћелија/ml

Synechococcus leopoliensis 5×10^4-10^5 ћелија/ml

1.8.5. Концентрације испитиване супстанце

Распон концентрација у којем се могу очекивати ефекти супстанце може се одредити на основу резултата испитивања за одређивање распона. За коначно главно испитивање одабрати најмање пет концентрација распоређених у геометријском низу уз фактор који не прелази 3,2. Код испитиваних супстанци чија је крива концентрација-одговор равна, понекад је оправдано користити виши фактор. Серија концентрација обухвата подручје у којем се јавља инхибиција раста алги 5%–75%.

1.8.6. Понављања и контроле

У поставци испитивања предвидети по три понављања за сваку испитивану концентрацију. Ако није потребно одредити NOEC, поставка испитивања се може променити тако да се повећа број концентрација и смањи број понављања по концентрацији. Број контролних понављања је најмање три, а у идеалном случају двоструко већи од броја понављања за сваку испитивану концентрацију.

За аналитичка одређивања концентрација испитиване супстанце може се припремити посебна серија раствора за

испитивање (видети одељак 1.8.11. ове методе).

Ако се за растварање испитиване супстанце користи растварач, у поставку испитивања се укључују додатне контроле које садрже исту концентрацију растварача као и код испитиване културе.

1.8.7. Припрема културе инокулума

Да би се тест алге прилагодиле условима испитивања и обезбедило да алге буду у фази експоненцијалног раста у тренутку када се користе за инокулацију раствора за испитивање, културу инокулума у подлози за испитивање припремити 2 до 4 дана пре почетка испитивања. Биомасу алги подесити тако да се омогући да преовлада експоненцијални раст у култури инокулума до почетка испитивања. Културу инокулума инкубирати у истим условима као испитиване културе. Мерењем повећања биомасе у култури инокулума уверити се да је раст у границама нормале за испитивани сој у условима гајења. Пример поступка гајења културе алги описан је у Додатку 3. ове методе. Да би се избегла истовремена деоба ћелија за време испитивања, може бити потребно спровести још један корак умножавања културе инокулума.

1.8.8. Припрема раствора за испитивање

Сви раствори за испитивање садрже исту концентрацију хранљиве подлоге и исту почетну биомасу испитиваних алги. Раствори за испитивање одабраних концентрација обично се припремају мешањем радног раствора испитиване супстанце са хранљивом подлогом и културом инокулума. Радни раствори се по правилу припремају растварањем супстанци у подлози за испитивање.

Растварачи, нпр. ацетон, *t*-бутил алкохол и диметилформамид могу да се користе као носачи за додавање супстанци слабо растворљивих у води у подлогу за испитивање[2,3]. Концентрација растварача не сме да пређе 100 µl/l и исту концентрацију додати свим културама (укључујући контроле) у серијама испитивања.

1.8.9. Инкубација

Судови за испитивање се затворе ваздушно-пропусним чеповима. Посуде се протресу и ставе у инкубатор за гајење. Алге током испитивања држати у суспензији да се олакша пренос CO_2. То се постиже сталним трешењем или мешањем. Културе држати на температури у распону од 21° C до 24° C уз толеранцију ± 2 °C. Код врста које нису наведене у Додатку 1, нпр. тропске врсте, могу одговарати више температуре, под условом да се могу испунити критеријуми валидности. Препоручује се да се судови насумично распореде у инкубатору и свакодневно размештају по инкубатору.

pH вредност контролне подлоге се током испитивања не сме повећати за више од 1,5 јединица. Код метала и једињења који делимично јонизују при pH вредностима око испитиване вредности понекад је нужно ограничити помак pH вредности како би се добили обновљиви и добро дефинисани резултати. Помак од < 0,5 pH јединица је технички изводљив и може се постићи осигуравањем одговарајућег преноса масе CO_2 из околног ваздуха у испитивани раствор, нпр. повећањем брзине тресења. Друга могућност је да се смањи потрошња CO_2 смањењем почетне биомасе или трајања испитивања.

На површини где се културе инкубирају осигурати непрекидно и равномерно флуоресцентно осветљење нпр. типа хладно бело (cool-white) или дневно светло (daylight). Различити сојеви алги и цијанобактерија имају различите потребе за светлошћу. Интензитет светла прилагодити испитиваним организмима. За препоручене врсте зелених алги, интензитет светла на нивоу раствора за испитивање одабрати у распону од 60 до 120 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, мерено у фотосинтетички ефикасном спектралном распону од 400 nm до 700 nm применом одговарајућег пријемника. Неке врсте, посебно *Anabaena flos-aquae*, расту добро на светлу слабијег интензитета и јако светло их може оштетити. Код тих врста одабрати просечни интензитет светла у распону од 40 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ до 60 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$. (Код инструмената за мерење интензитета светла баждарених у луксима, распон од 4.440 lux до 8.880 lux за хладно бело светло приближно одговара препорученом интензитету светла од 60 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$до 120 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$). Интензитет светла у простору инкубације не сме одступати више од ± 15% од просечног интензитета светла.

1.8.10. Трајање испитивања

Испитивање по правилу траје 72 сата. Ипак, испитивање може трајати и дуже или краће, под условом да могу да се задовоље сви критеријуми валидности из одељка 1.7. ове методе.

1.8.11. Мерења и аналитичка одређивања

Биомаса алги се у сваком суду одређује најмање једанпут дневно током испитивања. Ако се мерења спроводе на малој запремини пипетираној из раствора за испитивање, извађени раствор не замењивати.

Мерење биомасе спроводи се ручним бројањем ћелија под микроскопом или електронским бројачем честица (за број ћелија и/или биозапремину). Могу се користити и алтернативне технике, нпр. проточна цитометрија, флоуресценција хлорофила *in vitro* или *in vivo*[6,7], или оптичка густина, под условом да се може доказати задовољавајућа корелација са биомасом у оквиру распона биомаса које се јављају у испитивању.

pH вредност раствора мери се на почетку и на крају испитивања.

Уколико је на располагању аналитички поступак за одређивање испитиване супстанце у распону концентрација које се користе у испитивању, анализирати растворе за испитивање како би се провериле почетне концентрације и одржавање концентрација излагања током испитивања.

Анализа концентрације испитиване супстанце у једној ниској и једној високој испитиваној концентрацији на почетку и крају испитивања и концентрације око очекиване вредности EC_{50}, може бити довољна уколико се очекује да ће

концентрације излагања током испитивања одступати мање од 20% од номиналних вредности. Ако није вероватно да ће концентрације остати у оквиру 80% до 120% номиналне вредности, препоручује се анализа свих испитиваних концентрација на почетку и на крају испитивања. У случају испарљивих, нестабилних и јако адсорптивних испитиваних супстанци препоручује се да се током периода излагања обаве додатна узорковања и анализе у размацима од 24 сата како би се могао боље одредити губитак испитиване супстанце. Код таквих супстанци биће потребна додатна понављања. У свим случајевима, концентрацију испитиване супстанце одређивати само из једног понављања за сваки узорак испитиване концентрације (или у средњем узорку који се добија сједињавањем садржаја свих понављања).

Са подлогама за испитивање које су посебно припремљене за анализу концентрација излагања током испитивања поступати једнако као са подлогама на којима се спроводи испитивање тј. инокулисати их алгама и инкубирати у једнаким условима. Ако је потребно да се изврши анализа концентрације растворене испитиване супстанце, може бити неопходно да се одвоје алге од подлоге. Одвајање се ако је могуће врши лаганим центрифугирањем где је g-сила тек толика да се постигне таложење алги.

Ако се може доказати да се концентрација испитиване супстанце током укупног трајања испитивања на задовољавајући начин одржава у границама ± 20% номиналне или измерене почетне концентрације, анализа резултата се може заснивати на номиналним или измереним почетним вредностима. Ако је одступање од номиналне односно измерене почетне концентрације веће од ± 20%, анализа резултата се заснива на средњој геометријској концентрацији током излагања или моделима који описују опадање концентрације испитиване супстанце[3,8].

Испитивање инхибиције раста алги је динамичнији систем за испитивање у односу на већину испитивања краткотрајне токсичности у води. Стога је понекад тешко одредити стварне концентрације излагања, што нарочито важи за испитивања адсорптивних супстанци у ниским концентрацијама. У том случају нестанак супстанце из раствора адсорпцијом на растућу биомасу алги не значи да се она изгубила из система за испитивање. Када се анализира резултат испитивања, проверити да ли је смањење концентрације испитиване супстанце током испитивања праћено смањењем инхибиција раста. Ако је то случај, може се размотрити примена погодног модела који описује опадање концентрације испитиване супстанце[8]. У противном, можда ће бити потребно да се изврши анализа резултата на основу почетних (номиналних или измерених) концентрација.

1.8.12. Остала посматрања

На крају испитивања извршити микроскопско посматрање да се потврди нормалан и здрав изглед културе инокулума и уоче евентуалне промене у изгледу алги (које могу бити последица излагања испитиваној супстанци).

1.8.13. Гранично испитивање

У одређеним околностима, нпр. кад прелиминарно испитивање указује на то да испитивана супстанца нема токсично деловање у концентрацијама до 100 $mg \cdot l^{-1}$ или до њене границе растворљивости у подлози за испитивање (зависно од тога шта је мање), може се извршити гранично испитивање које подразумева поређење одговора у једној контролној групи и једној испитиваној групи (100 $mg \cdot l^{-1}$ или концентрација једнака граници растворљивости). Препоручује се да се уз гранично испитивање свакако изврши анализа концентрације излагања. За гранично испитивање важе сви горе поменути услови за испитивање и критеријуми валидности, с тим да број понављања у испитиваној групи не сме бити мањи од шест. Променљиве одговора у контролној и испитиваној групи могу се анализирати статистичким тестом за поређење средњих вредности нпр. Студентов т-тест. Ако су варијансе две групе неједнаке, извршити прилагођени т-тест за неједнаке варијансе.

1.8.14. Модификација за јако обојене супстанце

Зрачење (интензитет светла) треба да буде у горњем делу распона прописаног за ову методу испитивања: 120µE m^{-2} s^{-1} или више.

Пут светла скратити смањењем запремине раствора за испитивање (у распону од 5 ml до 25 ml).

Треба довољно промућкати (на пример умереним трешењем) како би се обезбедила висока учесталост излагања алги високом зрачењу на површини културе.

2. ПОДАЦИ

2.1. ГРАФИЧКИ ПРИКАЗ КРИВЕ РАСТА

Биомаса у посудама за испитивање може да се изрази у јединицама мереног алтернативног параметра (нпр. број ћелија, флуоресценција).

Да би се добио графички приказ кривих раста, израдити табелу процењених концентрација биомасе у испитиваним и контролним културама, заједно са концентрацијама испитиваног материјала, које се бележе са резолуцијом од најмање једног целог сата, и временима мерења. У овој првој фази могу бити корисне и логаритамске и линеарне скале, али су логаритамске скале обавезне и уопштено дају бољи приказ промена узорка раста у периоду испитивања. Треба имати у виду да кад се експоненцијални раст прикаже на логаритамској скали, као резултат се добије правац, а нагиб правца показује специфичну брзину раста.

На графичким приказима проверити да ли контролне културе расту експоненцијално и очекиваном брзином током испитивања. Треба критички преиспитати све тачке података и изглед графика и проверити сирове податке и поступке како би се утврдиле евентуалне грешке. Посебно проверити оне тачке података код којих се чини да су одступања као последица системске грешке. Ако је очигледно и/или врло вероватно да се ради о грешкама у поступку, конкретна тачка се обележава као вредност која се не уклапа и искључује се из касније статистичке анализе. Нулта концентрација алги у суду са једним од два или три понављања може указивати на то да посуда није правилно инокулисана или да није била добро очишћена). У

извештају о испитивању јасно навести зашто је нека тачка одбачена као вредност која се не уклапа. Прихватљиви разлози су само (ретке) грешке у поступку, али не и лоша прецизност. Статистички поступци за утврђивање вредности које се не уклапају имају ограничену примену код ове врсте проблема и не могу заменити стручно просуђивање. Вредности које се не уклапају (означене као такве) по могућству задржати међу тачкама података које се приказују у каснијим графичким односно табеларним приказима података.

2.2. ПРОМЕНЉИВЕ ВЕЛИЧИНЕ ОДГОВОРА

Сврха испитивања је да се утврде ефекти испитиване супстанце на раст алги. У овој методи испитивања описане су две променљиве величине одговора, због различитог начина регулисања у државама. Да би резултати испитивања били прихватљиви у свим државама, ефекте оцењивати применом обе променљиве величине одговора:

а) Просечна специфична брзина раста: ова променљива величина одговора израчунава се на основу логаритамског повећања биомасе у периоду испитивања, израженог по дану;

б) Прираст: ова променљива величина одговора представља разлику између биомасе на крају испитивања и почетне биомасе.

Да би ова метода испитивања могла да се примени израчунавање резултата треба да се заснива на просечној специфичној брзини раста из разлога наведених у даљем тексту. Треба напоменути да вредности токсичности израчунате применом те две променљиве величине одговора нису упоредиве и ту разлику узети у обзир код коришћења резултата испитивања. Ако су поштовани услови испитивања ове методе, вредности EC_x које се заснивају на просечној специфичној брзини раста (E_rC_x) уопштено ће бити више од резултата заснованих на приросту (E_yC_x) због разлике у математичкој основи та два приступа. То не тумачити као разлику у осетљивости две променљиве величине одговора, већ просто прихватити да су те вредности математички различите. Појам просечне специфичне брзине раста заснива се на општем обрасцу експоненцијалног раста алги у културама које нису изложене ограничавајућим факторима, где се токсичност процењује на основу учинака на брзину раста независно од апсолутне вредности специфичне брзине раста у контролној групи, нагиба криве концентрација-одговор или трајања испитивања. За разлику од тога, резултати који се заснивају на променљивој величини одговора „прираст" зависе од свих тих других променљивих величина. E_yC_x зависи од специфичне брзине раста врста алги које се користе у сваком испитивању и од максималне специфичне стопе раста која се може разликовати између врста, па чак и између сојева алги. Ову променљиву одговора не користити за упоређивање осетљивости на отрове међу врстама алги, па чак ни међу различитим сојевима. Иако се, са научне тачке гледишта, процени токсичности на основу просечне специфичне брзине раста даје предност, у ову методу испитивања укључене су и процене на основу прираста како би се задовољили тренутни регулаторни захтеви у неким државама.

2.2.1. Просечна брзина раста

Просечна специфична брзина раста у одређеном периоду израчунава се као логаритамско повећање биомасе у сваком контролном и испитиваном суду применом једначине:

$$\mu_{i-j} = \frac{lh\, X_j - ln\, X_i}{t_j - t_i} \left(\text{дан}^{-1}\right)$$

при чему:

μ_{i-j} јесте просечна специфична брзина раста од времена i до времена j;

X*i* јесте биомаса у времену i;

X_j јесте биомаса у времену j.

За сваку испитивану и контролну групу израчунати средњу вредност брзине раста са проценом варијансе.

Израчуна се просечна специфична брзина раста за укупно време испитивања (обично 0–3. дан); притом се уместо измерене почетне вредности као почетна вредност узима номинална инокулисана биомаса, јер се на тај начин по правилу постиже већа прецизност. Ако опрема која се користи за мерење биомасе омогућава довољно прецизно одређивање биомасе и код мале биомасе инокулума (нпр. проточни цитометар), може се користити измерена почетна концентрација биомасе. Осим тога, одредити етапну брзину раста, која се израчунава као специфична брзина раста за сваки дан испитивања (0–1, 1–2. и 2–3. дан) и проверити да ли је контролна брзина раста стална (видети критеријуме валидности, одељак 1.7. ове методе). Ако је специфична брзина раста првога дана знатно нижа од укупне просечне специфичне брзине, то може указивати на фазу прилагођавања. Иако фаза прилагођавања у контролним културама може да се смањи и готово елиминише правилним размножавањем предкултуре, кад су у питању изложене културе, фаза прилагођавања може бити знак опоравка након првобитног токсичног шока или смањеног излагања услед губитка испитиване супстанце (укључујући сорпцију на биомасу алги) након почетног излагања. Стога се може оценити етапни раст како би се оценили ефекти испитиване супстанце који се јављају током периода излагања. Значајне разлике између етапне брзине раста и просечне брзине раста указују на одступање од сталног експоненцијалног раста и упозоравају да је потребно детаљно преиспитивање крива раста.

Проценат инхибиције брзине раста за поједина понављања у испитиваним групама израчунава се помоћу једначине:

$$\%I_r = \frac{\mu_C - \mu_T}{\mu_C} \times 100$$

при чему:

$\%I_r$ јесте проценат инхибиције просечне специфичне брзине раста;

μ_C јесте средња вредност просечне специфичне брзине раста (m) у контролној групи;

μ_T јесте просечна специфична брзина раста понављања у испитиваној групи.

Ако се за припрему раствора за испитивање користе растварачи, за израчунавање процента инхибиције користити контроле са растварачем, а не оне без растварача.

2.2.2. Прираст

Прираст се израчунава као биомаса на крају испитивања умањена за почетну биомасу у сваком контролном и испитиваном суду. За сваку испитивану концентрацију и контролу израчунати средњу вредност прираста са проценом варијансе. Проценат инхибиције прираста ($\% I_y$) за појединачна понављања у испитиваној групи може се израчунати на следећи начин:

$$\%I_y = \frac{Y_C - Y_T}{Y_C} \times 100$$

при чему:

$\%I_y$ јесте проценат инхибиције прираста;

Y_C јесте средња вредност прираста у контролној групи;

Y_T јесте вредност прираста понављања у испитиваној групи.

2.3 ПРИКАЗ КРИВЕ КОНЦЕНТРАЦИЈА – ОДГОВОР

Направи се графички приказ процента инхибиције у односу на логаритам концентрације испитиване супстанце и добијени график се детаљно прегледа, занемарујући све тачке података које су у првој фази издвојене као вредности које се не уклапају. Кроз тачке података повуче се глатка крива простим оком или рачунарском интерполацијом, како би се добио први утисак односа концентрација-одговор, и затим се наставља са детаљнијом методом, по могућству рачунарском статистичком методом. Зависно од предвиђене употребе података, квалитета (прецизности) и количине података као и расположивости алата за анализу података, може се донети одлука (која је понекад сасвим оправдана) да се у овој фази прекине анализа података и једноставно очитају кључне вредности EC_{50} и EC_{10} (и/или EC_{20}) са криве повучене простим оком (видети и одељак у наставку о стимулаторним ефектима). Неки од валидних разлога за некоришћење статистичке методе су:

– с обзиром на расположиве податке, рачунарским методима не могу се добити поузданији резултати од оних који се могу добити стручним просуђивањем – може се десити да неки рачунарски програми уопште не дају никакво поуздано решење (итерације не конвергирају итд),

– расположиви рачунарски програми нису подесни за обраду ефеката стимулације раста (видети у даљем тексту).

2.4. СТАТИСТИЧКИ ПОСТУПЦИ

Циљ је да се добије квантитативни однос концентрација-одговор регресионом анализом. Ако се изврши линеарна трансформација података одговора – нпр. у јединице пробит, логит или Вејбуловог модела[9] – може се извршити пондерисана линеарна регресија; ипак, предност се даје поступцима нелинеарне регресије, које боље решавају проблем неизбежних неправилности података и одступања од правилних расподела. Приближавањем нултој или потпуној инхибицији те неправилности могу трансформацијом и додатно да се повећају и тако отежају анализу[9]. Стандардне аналитичке методе које користе пробит, логит или Вејбулове трансформације намењене су кванталним подацима (нпр. смртност или преживљавање) и посебно се прилагођавају да би се могле применити на податке о расту и биомаси. Конкретни поступци за одређивање вредности EC_x из континуираних података могу се наћи у литератури[10,11,12]. Коришћење нелинеарне регресионе анализе детаљније је описано у Додатку 4. ове методе.

За сваку променљиву одговора која се анализира из односа концентрација – одговор израчунати тачке на основу којих се процењују вредности EC_x. Ако је могуће, за све процене одредити границе поузданости од 95%. Ваљаност подударања података одговора са регресионим моделом процењује се графички или статистички. Регресиону анализу вршити на основу појединачних одговора у понављањима, а не на основу средњих вредности испитиваних група. Уколико је нелинеарно подешавање криве тешко или немогуће због велике разуђености података, проблем се може заобићи израчунавањем регресије на средњим вредностима по групама као практичним начином да се смањи утицај могућих вредности које се не уклапају. Ако се користи ова опција, то навести у извештају о испитивању као одступање од уобичајеног поступка уз напомену да прилагођавање криве појединачним понављањима није дало добар резултат.

Ако расположиви регресивни модели/методе нису подесни за податке, процене EC_{50} и границе поузданости могу се добити и линеарном интерполацијом са методом поновног узорковања са понављањем (bootstrapping)[13].

За процену LOEC, а тиме и NOEC, у вези са ефектима испитиване супстанце на брзину раста потребно је упоредити средње вредности обраде применом техника анализе варијансе (у даљем тексту: ANOVA). Затим средњу вредност за сваку концентрацију упоредити са контролном средњом вредношћу применом одговарајуће методе вишеструког поређења или испитивања тренда. Овде може бити користан Данетов или Вилијамсов тест[14,15,16,17,18]. Треба проверити да ли је претпоставка хомогености варијанси ANOVA реална. Процена се може извршити графички или формалним тестом[18]. Погодни су Левенеов и Бартлетов тест. Ако претпоставка хомогености варијанси није задовољена, то се понекад може исправити логаритамском

трансформацијом података. Ако је хетерогеност варијансе превелика да би се могла исправити трансформацијом, размотрити могућност анализе методама као што су Јонкхереови „step-down" тестови тренда. Додатне смернице за одређивање NOEC могу се наћи у литератури[12].

Новија научна сазнања довела су до препоруке да се појам NOEC напусти и замени проценама тачака EC_x добијених регресијом. За овај тест са алгама није утврђена одређена вредност x. Изгледа да је распон од 10% до 20% одговарајући (зависно од одабране променљиве величине одговора), а пожељно је да се наведу обе вредности, EC_{10} и EC_{20}.

2.5. СТИМУЛАЦИЈА РАСТА

Понекад се при ниским концентрацијама може запазити стимулација раста (негативна инхибиција). То може бити последица хормезиса (токсичка стимулација) или уношења стимулативних фактора раста са испитиваним материјалом у употребљену минималну подлогу. Треба имати у виду да додавање неорганских хранљивих материја не би смело да има никакав директан утицај будући да подлога која се користи током испитивања треба стално да садржи вишак хранљивих супстанци. Стимулација при ниским дозама се по правилу може занемарити код израчунавања EC_{50} осим ако је она екстремно висока. У случају ектремне стимулације, или кад је потребно израчунати EC_x за ниске вредности x, понекад је потребно применити посебне поступке. Брисање стимулативних одговора из анализе података избегавати, а ако расположиви софтвер за прилагођавање криве не може да прихвати мале вредности стимулације, може се користити линеарна интерполација са методом поновног узорковања са понављањем (bootstrapping). У случају екстремне стимулације може се размотрити примена хормезис модела[19].

2.6. НЕТОКСИЧНА ИНХИБИЦИЈА РАСТА

Испитивани материјали који апсорбују светло могу изазвати смањење брзине раста јер стварање сенке смањује расположиву количину светла. Ове и друге сличне физичке ефекте одвојити од токсичних ефеката изменом услова испитивања и посебно их навести у извештају о испитивању. Смернице се могу пронаћи у литератури[2,3].

3. ИЗВЕШТАВАЊЕ

3.1. ИЗВЕШТАЈ О ИСПИТИВАЊУ

Извештај о испитивању садржи податке о:

1) Испитиваној супстанци:

– агрегатно стање и релевантна физичко-хемијска својства, укључујући границу растворљивости у води,

– подаци за идентификацију хемикалије, укључујући чистоћу.

2) Испитиваној врсти:

– сој, добављач односно извор и услови гајења.

3) Условима испитивања:

– датум почетка и трајање испитивања;

– опис испитивања: судови за испитивање, запремине културе, густина биомасе на почетку испитивања;

– састав подлоге;

– испитиване концентрације и понављања (нпр. број понављања, број испитиваних концентрација и примењена геометријска прогресија);

– опис припреме раствора за испитивање, укључујући примену растварача итд.;

– инкубатор за гајење;

– интензитет и квалитет светла (извор, хомогеност);

– температура;

– испитиване концентрације: номиналне испитиване концентрације и резултати анализа за одређивање концентрације испитиване супстанце у посудама за испитивање. Треба навести ефикасност методе и границу квантификације у испитиваном матриксу;

– сва одступања од ове методе испитивања;

– метод одређивања биомасе и доказ корелације између измереног параметра и суве масе.

4) Резултатима:

– pH вредности на почетку и крају испитивања у свим обрадама;

– биомаса сваке тиквице у свакој мерној тачки и метод мерења биомасе;

– криве раста (графички приказ биомасе у зависности од времена);

– израчунате променљиве одговора за свако понављање, укључујући средње вредности и коефицијент варијације за понављања;

– графички приказ односа концентрација/ефекат;

– процене токсичности за променљиве одговора, нпр. EC_{50}, EC_{10}, EC_{20} и одговарајући интервали поверења. Ако се израчунавају LOEC и NOEC, њихове вредности и статистичке методе које су употребљене за одређивање;

– ако се користи ANOVA, величина ефекта који се може утврдити (нпр. најмања значајна разлика);

– евентуална стимулација раста у било којом узорку;

– сви остали запажени ефекти, нпр. морфолошке промене алги;

– тумачење резултата, укључујући могући утицај одступања од методе испитивања на резултате испитивања.

4. ЛИТЕРАТУРА

1. OECD TG 201 (2006). Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test.

2. ISO 1998: Water quality – Guidance for algal growth inhibition tests with poorly soluble materials, volatile compounds, metals and waster water. ISO/DIS 14442.

3. OECD 2000: Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, no. 23.

4. ISO 1998: Water quality – Sampling – Part 16: General Guidance for Biotesting. ISO 5667-16.

5. ISO 1993: Water quality – Algal growth inhibition test. ISO 8692.

6. Mayer, P., Cuhel, R. and Nyholm, N. (1997). A simple in vitro fluorescence method for biomass measurements in algal growth inhibition tests. Water Research 31: 2525-2531.

7. Slovacey, R.E. and Hanna, P.J. In vivo fluorescence determinations of phytoplancton chlorophyll, Limnology & Oceanography 22,5 (1977), pp.919-925.

8. Simpson, S.L., Roland, M.G.E., Stauber, J.L. and Batley, G.E. (2003). Effect of declining toxicant concentrations on algal bioassay endpoints. Environ. Toxicol. Chem 22, 2073-2079.

9. Christensen, E.R., Nyholm, N. (1984): Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves. Env. Sci. Technol. 19, 713-718.

10. Nyholm, N. Sørensen, P.S., Kusk, K.O. and Christensen, E.R. (1992): Statistical treatment of data from microbial toxicity tests. Environ. Toxicol. Chem. 11, 157-167.

11. Bruce, R.D., and Versteeg, D.J. (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Env. Toxicol. Chem. 11:1485-1494.

12. OECD. (2004). Guidance Document on Statistical Analysis of Ecotoxicity Data.

13. Norberg-King T.J. (1988). An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach. National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88. USEPA, Duluth, MN.

14. Dunnett, C.W. (1955). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statist. Assoc. 50: 1096-1121

15. Dunnett, C.W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics 20: 482-491.

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

17. Williams, D.A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28: 510-531.

18. Draper, N.R. and Smith, H. (1981). Applied Regression Analysis, second edition. Wiley, New York.

19. Brain P. and Cousens R. (1989). An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses. Weed Research, 29, 93-96.

Део други
ДОДАТАК 1.

СОЈЕВИ КОЈИ СУ СЕ ПОКАЗАЛИ ПОГОДНИМ ЗА ИСПИТИВАЊЕ

Зелене алге

– *Pseudokirchneriella subcapitata*, (раније позната као *Selenastrum capricornutum*), ATCC 22662, CCAP 278/4, 61.81 SAG

– *Desmodesmus subspicatus* (раније позната као *Scenedesmus subspicatus*) 86.81 SAG

Дијатомеје

– *Navicula pelliculosa*, UTEX 664

Цијанобактерије

– *Anabaena flos-aquae*, UTEX 1444, ATCC 29413, CCAP 1403/13A

– *Synechococcus leopoliensis*, UTEX 625, CCAP 1405/1

Извори сојева

Препоручени сојеви расположиви су у културама једне врсте алги из следећих збирки (абецедним редом):

ATCC: American Type Culture Collection

10801 University Boulevard

Manassas, Virginia 20110-2209

СЈЕДИЊЕНЕ АМЕРИЧКЕ ДРЖАВЕ

CCAP, Culture Collection of Algae and Protozoa

Institute of Freshwater Ecology,

Windermere Laboratory

Far Sawrey, Ambleside

Cumbria

LA22 0LP

УЈЕДИЊЕНО КРАЉЕВСТВО

SAG: Collection of Algal Cultures

Inst. Plant Physiology

University of Göttingen

Nicholausberger Weg 18

3400 Göttingen

НЕМАЧКА

UTEX Culture Collection of Algae

Section of Molecular, Cellular and Developmental Biology

School of Biological Sciences

the University of Texas at Austin

Austin, Texas 78712

СЈЕДИЊЕНЕ АМЕРИЧКЕ ДРЖАВЕ

Табела: Изглед и својства препоручених врста

	P. subcapitata	*D. subspicatus*	*N. pelliculosa*	*A. flos-aquae*	*S. leopoliensis*
Изглед	Закривљене, увијене, појединачне ћелије	Дугуљасте, већином појединачне ћелије	Штапићасте	Ланци дугуљастих ћелија	Штапићасте
Величина (Д × Ш)* μm	8-14 × 2-3	7-15 × 3-12	7,1 × 3,7	4,5 × 3	6 × 1
Запремина ћелија (μm^3/ћелија)	40-60 [1]	60-80 [1]	40-50 [1]	30-40 [1]	2,5 [2]

Сува маса ћелија (mg/ћелија)	2-3 × 10^{-8}	3-4 × 10^{-8}	3-4 × 10^{-8}	1-2 × 10^{-8}	2-3 × 10^{-9}
Брзина раста [3] дан$^{-1}$)	1,5-1,7	1,2-1,5	1,4	1,1-1,4	2,0-2,4

[1] Мерено електронским бројачем честица.

[2] Израчунато из величине.

[3] Најчешће запажена брзина раста у OECD подлози при интензитету светла око 70 μE·m^{-2}·s^{-1} и температури 21°C.

* Д × Ш јесте дужина пута ширина.

Посебне препоруке за гајење и руковање препорученим испитиваним врстама

Pseudokirchneriella subcapitata и *Desmodesmus subspicatus*

Ове зелене алге генерално се лако одржавају у различитим подлогама културе. Информације о погодним подлогама могу се добити у збиркама култура. По правилу се ради о појединачним ћелијама и мерења густине ћелија могу се једноставно обавити уз помоћ електронског бројача честица или микроскопа.

Anabaena flos-aquae

За држање радне културе могу се користити различите хранљиве подлоге. Посебно је важно да се не дозволи да шаржна култура код обнављања не прође логаритамску фазу раста јер је тада регенерација тешка.

Anabaena flos-aquae ствара скупине испреплетених ланаца ћелија. Величина скупина може бити различита, зависно од услова гајења. Скупине понекад разбити ако се биомаса одређује бројањем под микроскопом или електронским бројачем честица.

Да би се смањила варијабилност резултата бројања, ланци се могу разбити ултразвучном обрадом подузорака. Ултразвучна обрада не сме трајати дуже него што је потребно да се ланци разбију на краће ланце, јер се у противном ћелије могу уништити. Интензитет и трајање ултразвучне обраде једнаки су код свих узорака.

На хемоцитометру избројати довољан број поља (најмање 400 ћелија) да би се смањила одступања. Тиме се побољшава поузданост микроскопских одређивања густине.

Након што се ланци ћелија разбију пажљивом ултразвучном обрадом, за одређивање укупне количине ћелија *Anabaena* може се користити електронски бројач честица. Ултразвучну енергију подесити тако да се избегне оштећење ћелија.

Да би се добила добро измешана и хомогена суспензија алги за инокулацију посуда за испитивање, користити мешалицу без одбојника („вортекс”) или сличан одговарајући поступак.

Судове за испитивање ставити на ротациону или хоризонталну тресилицу на око 150 обртаја у минути. Други начин да се смањи тенденција стварања грудвица код *Anabaena* је периодично мућкање. Код појаве грудвица пазити да се за мерење биомасе добију репрезентативни узорци. Понекад је пре узорковања потребно снажно протрести судове да би се разбиле грудвице алги.

Synechococcus leopoliensis.

За држање радне културе могу се користити различите хранљиве подлоге. Информације о погодним подлогама могу се добити у збиркама култура.

Synechococcus leopoliensis расте у облику појединачних штапићастих ћелија. Ћелије су веома мале, што отежава мерење биомасе бројањем под микроскопом. Овде могу да помогну електронски бројачи честица опремљени за бројање честица до величине од око 1 μm. Осим тога, могу се користити флуорометријска мерења *in vitro*.

Navicula pelliculosa

За држање радне културе могу се користити различите хранљиве подлоге. Информације о погодним подлогама могу се добити у збиркама култура. Водити рачуна о томе да подлога садржи силикат.

Navicula pelliculosa може у одређеним условима раста да ствара наслаге. Ћелије алги понекад имају тенденцију да се накупљају у површинској емулзији због производње липида. У тим околностима код узимања подузорака за одређивање биомасе предузимају се посебне мере да би се добили репрезентативни узорци. Понекад је потребно и снажно протресање нпр. уз помоћ мешалице без одбојника („вортекс”).

ДОДАТАК 2.
ХРАНЉИВЕ ПОДЛОГЕ

Може се користити једна од две хранљиве подлоге:

Подлога OECD TG 201 јесте изворна подлога Упутства за испитивање OECD 201, такође је у складу са стандардом ISO 8692.

Подлога AAP US. EPA такође је у складу са стандардом ASTM.

Код припреме ових подлога користити хемикалије чистоће PA („pro analysis”) односно хемикалије аналитичке чистоће и дејонизовану воду.

Табела: Састав подлоге AAP (US. EPA) и подлоге OECD TG 201

Састојак	EPA		OECD	
	mg/l	mM	mg/l	mM
$NaHCO_3$	15,0	0,179	50,0	0,595
$NaNO_3$	25,5	0,300		
NH_4Cl			15,0	0,280
$MgCl_2 \cdot 6(H_2O)$	12,16	0,0598	12,0	0,0590
$CaCl_2 \cdot 2(H_2O)$	4,41	0,0300	18,0	0,122
$MgSO_4 \cdot 7(H_2O)$	14,6	0,0592	15,0	0,0609
K_2HPO_4	1,044	0,00599		
KH_2PO_4			1,60	0,00919
$FeCl_3 \cdot 6(H_2O)$	0,160	0,000591	0,0640	0,000237
$Na_2EDTA \cdot 2(H_2O)$	0,300	0,000806	0,100	0,000269 [*]
H_3BO_3	0,186	0,00300	0,185	0,00299
$MnCl_2 \cdot 4(H_2O)$	0,415	0,00201	0,415	0,00210
$ZnCl_2$	0,00327	0,000024	0,00300	0,0000220
$MnCl_2 \cdot 4(H_2O)$	0,00143	0,000006	0,00150	0,00000630
$Na_2MoO_4 \cdot 2(H_2O)$	0,00726	0,000030	0,00700	0,0000289
$CuCl_2 \cdot 2(H_2O)$	0,000012	0,00000007	0,00001	0,00000006
pH	7,5		8,1	

[*] Моларни однос EDTA – гвожђе је нешто већи од један. Тиме се спречава таложење гвожђа и истовремено смањује хелирање тешких металних јона.

Код испитивања са дијатомејом *Navicula pelliculosa* обе подлоге допунити са Na2SiO3·9H2O тако да се добије концентрација од 1,4 mg Si/l.

pH вредност подлоге одређује се кад се успостави карбонатна равнотежа између подлоге и CO_2 у атмосферском ваздуху. Приближни однос између pH на 25 °C и моларне концентрације бикарбоната произлази из формуле:

$pH_{eq} = 11{,}30 + log\ [HCO3]$

Код 15 mg $NaHCO_3$, pH_{eq} = 7,5 (подлога U.S. EPA), а код 50 mg $NaHCO_3$/l, pH_{eq} = 8,1 (подлога OECD).

Табела: Елементарни састав подлога за испитивање

Елемент	EPA	OECD
	mg/l	mg/l
C	2,144	7,148

N	4,202	3,927
P	0,186	0,285
K	0,469	0,459
Na	11,044	13,704
Ca	1,202	4,905
Mg	2,909	2,913
Fe	0,033	0,017
Mn	0,115	0,115

Табела: Припрема подлоге OECD

Хранљива материја	Концентрација у радном раствору
Радни раствор 1: макронутријенти	
NH_4Cl	1,5 $g \cdot l^{-1}$
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	1,2 $g \cdot l^{-1}$
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	1,8 $g \cdot l^{-1}$
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1,5 $g \cdot l^{-1}$
KH_2PO_4	0,16 $g \cdot l^{-1}$
Радни раствор 2: гвожђе	
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	64 $mg \cdot l^{-1}$
$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	100 $mg \cdot l^{-1}$
Радни раствор 3: елементи у траговима	
H_3BO_3	185 $mg \cdot l^{-1}$
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	415 $mg \cdot l^{-1}$
$ZnCl_2$ $CoCl_2 \cdot 6H_2O$	3 $mg \cdot l^{-1}$
$CoCl_2.6H_2O$	1,5 $mg \cdot l^{-1}$
$CuCl_2.2H_2O$	0,01 $mg \cdot l^{-1}$
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	7 $mg \cdot l^{-1}$
Радни раствор 4: бикарбонат	
$NaHCO_3$ $Na_2SiO_3 \cdot 9H_2O$	50 $g \cdot l^{-1}$

Радни раствори се стерилишу мембранском филтрацијом (средњи пречник пора 0,2 μm) или обрадом у аутоклаву (120° C, 15 min). Раствори се чувају у мраку на температури од 4° C.

Радни раствори 2 и 4 не стерилишу се у аутоклаву, већ искључиво мембранском филтрацијом.

Хранљива подлога припрема се додавањем одговарајуће запремине радних раствора 1–4 у воду, и то:

У 500 ml стерилисане воде дода се:

– 10 ml радног раствора 1,

– 1 ml радног раствора 2,

– 1 ml радног раствора 3,

– 1 ml радног раствора 4.

Допуни се стерилизованом водом до 1000 ml.

Треба оставити довољно времена за успостављање равнотеже између подлоге и атмосферског CO_2, према потреби удувавањем стерилног филтрираног ваздуха у трајању од неколико сати.

Припрема подлоге AAP

1.1. У приближно 900 ml дејонизоване или дестиловане воде дода се по 1 ml радних раствора из A1.2.1. – A1.2.7. и разблажи до 1 l.

A1.2. Припреми се радни раствори са макронутријентима растварањем следећих количина супстанце у 500 ml дејонизоване или дестиловане воде. Реагенси A1.2.1, A1.2.2, A1.2.3. и A1.2.4. се могу објединити у један радни раствор.

A1.2.1. $NaNO_3$ – 12,750 g.

A1.2.2. $MgCL_2 \cdot 6H_2O$ – 6,082 g.

A1.2.3. $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ – 2,205 g.

A1.2.4. Радни раствор са микронутријентима – (видети напомену A1.3. ове методе).

A1.2.5. $MgSO_4$ $7H_2O$ – 7,350 g.

A1.2.6. K_2HPO_4 – 0,522 g.

A1.2.7. $NaHCO_3$ – 7,500 g.

A1.2.8. $Na_2SiO_3 \cdot 9H_2O$ – видети напомену A1.1.

Напомена A1.1. – Користити само код испитивања с дијатомејама. Може се додати директно (202,4 mg) или путем радног раствора тако да се добије коначна концентрација 20 mg/l Si у подлози.

A1.3. Припреми се радни раствор са макронутријентима растварањем следећих количина супстанце у 500 ml дејонизоване или дестиловане воде.

A1.3.1. H_3BO_3 – 92,760 mg.

A1.3.2. $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ – 207,690 mg.

A1.3.3. $ZnCl_2$ – 1,635 mg.

A1.3.4. $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ – 79,880 mg.

A1.3.5. $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ – 0,714 mg.

A1.3.6. $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ – 3,630 mg.

A1.3.7. $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ – 0,006 mg.

A1.3.8. $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$ – 150,000 mg.

[динатријум-етилендиаминтетраацетат].

A1.3.9. $Na_2SeO_4 \cdot 5H_2O$–0,005 mg видети напомену A1.2

Напомена A1.2 Користити само у подлози за радне културе са дијатомејама.

A1.4. pH подесити на 7,5 ± 0,1 са 0,1 N или 1,0 N NaOH или HCl.

A1.5. Подлога се профилтрира у стерилну посуду кроз мембрански филтер 0,22 µm, ако се користи бројач честица, или кроз мембрански филтер 0,45-µm, ако се не користи бројач честица.

A1.6. Подлога се до употребе чува у мраку на температури од око 4° C.

ДОДАТАК 3.
ПРИМЕР ПОСТУПКА ЗА ГАЈЕЊЕ КУЛТУРЕ АЛГИ

Опште напомене

Гајење култура у складу са овим поступком спроводи се ради добијања култура алги за токсиколошка испитивања.

Треба користити одговарајуће методе како се културе алги не би контаминирале бактеријама. Аксеничне културе могу бити пожељне, али се успостављају и користе културе које садрже само једну врсту алги.

Све поступке обављати у стерилним условима како би се избегло загађење бактеријама и другим алгама.

Опрема и материјали

Видети Део први ове методе, одељак 1.8.1.

Поступци за добијање култура алги

Припрема хранљивих раствора (подлога)

Све хранљиве соли подлоге припремају се као концентровани радни раствори и чувају на тамном и хладном месту. Ови раствори се стерилишу филтрацијом или обрадом у аутоклаву.

Подлога се припрема додавањем одговарајуће количине радног раствора у стерилну дестиловану воду, пазећи да не дође до инфекције. Код чврстих подлога додаје се 0,8% агара.

Радна култура

Радне културе су мале културе алги које се редовно пресејавају у свежу подлогу и користе као полазни испитивани материјал. Ако се културе не користе редовно, оне се наносе на коси агар. Културе се пресејавају у свежу подлогу најмање једанпут у два месеца.

Радне културе се гаје у ерленмајерима који садрже одговарајућу подлогу (око 100 ml). Када се алге инкубирају на 20° C уз непрекидно осветљење, потребно је недељно пресејавање.

Код пресејавања, одређена количина „старе" културе се пренесе стерилним пипетама у суд са свежом подлогом тако да код брзорастућих врста почетна концентрација буде око 100 пута нижа него у старој култури.

Брзина раста врсте може се одредити из криве раста. Ако је она позната, могуће је проценити густину при којој културу пренети у нову подлогу. То се чини пре него што култура достигне фазу одумирања.

Предкултура

Предкултура треба да да одређену количину алги које су погодне за инокулацију испитиваних култура. Предкултура се инкубира у условима испитивања и користи док још експоненцијално расте, по правилу након периода инкубације од 2 дана до 4 дана. Културе алги које садрже деформисане или абнормалне ћелије одбацити.

ДОДАТАК 4.
АНАЛИЗА ПОДАТАКА НЕЛИНЕАРНОМ РЕГРЕСИЈОМ

Опште напомене

Код испитивања са алгама и других испитивања микробиолошког раста – раста биомасе одговор је по природи ствари континуирана или метричка променљива: брзина процеса, ако се користи брзина раста, односно њен временски интеграл, ако је одабрана биомаса. Оба параметра се стављају у однос према одговарајућем средњем одговору понављања неизложених контрола које најјаче реагују на дате услове – у испитивању са алгама најважнији фактори су светлост и температура. Систем је подељен или хомоген, а биомаса се може посматрати као континуум без разматрања појединачних ћелија. Расподела варијансе за одговоре какви се јављају код оваквих система зависи искључиво од пробних фактора (који се обично описују путем log-нормалних или нормалних расподела грешке). То је у супротности са типичним одговорима код биоанализе са кванталним подацима, где се толеранција (по правилу са биномном расподелом) појединачних организама често сматра доминантном компонентом варијансе. Овде су одговори контрола нула или на нивоу основне вредности.

У најједноставнијем случају нормирани односно релативни одговор, r, равномерно опада од 1 (нулта инхибиција) до 0 (стопостотна инхибиција). Треба запазити да су сви одговори повезани са грешком и да се очигледне негативне инхибиције могу израчунати само као резултат случајне грешке.

Регресиона анализа

Модели

Циљ регресионе анализе је да се квантитативно опише крива концентрација-одговор у облику математичке регресионе функције Y = f (C) или чешће F (Z), где је Z = log C. Инверзна функција C = f−1 (Y) омогућава израчунавање вредности EC_x, укључујући EC_{50}, EC_{10} и EC_{20} и њихове границе поузданости од 95%. Показало се да неколико једноставних математичких функција успешно описују односе концентрација-одговор који се добијају у испитивањима инхибиције раста алги. Те функције обухватају нпр. логистичку једначину, несиметричну Вејбулову једначину и функцију log-нормалне расподеле, које све представљају сигмоидне криве које се асимптотски приближавају вредности 1 кад C → 0 и нули кад C → бесконачно.

У последње време, као алтернатива асимптотским моделима предлаже се коришћење модела непрекинуте функције с прагом (нпр. Кojманов модел „инхибиције раста популације", Kooijman *et al*., 1996). Код овог модела полази се од претпоставке да у концентрацијама испод одређеног прага (EC0+) нема никаквих ефеката; EC0+ се процењује екстраполацијом односа концентрација – одговор са пресеком у оси концентрације применом једноставне непрекинуте функције, која није диференцијабилна у полазној тачки.

Треба запазити да се анализа може поједноставити методом најмањих квадрата (уз претпоставку сталне варијансе) или пондерисаних квадрата, ако се исправља хетерогеност варијансе.

Поступак

Поступак се може укратко описати на следећи начин: одабере се одговарајућа функционална једначина, Y = f (C), и прилагоди подацима нелинеарном регресијом. Пожељно је да се уместо средњих вредности понављања користе мерења појединачних узорака/судова како би се из података извукло што је могуће више информација. Са друге стране, ако је варијанса висока, практична искуства показују да средње вредности понављања могу дати поузданију математичку процену уз

мањи утицај системских проблема него што је то случај када се задрже појединачне тачке.

Направи се графички приказ подешене криве и измерених вредности и провери да ли је подешавање исправно обављено. Овде се нарочито корисном може показати анализа резидуала. Ако функционални однос који је одабран за прилагођавање криве концентрација-одговор не описује добро читаву криву или неки њен битни део, нпр. одговор при ниским концентрацијама, за прилагођавање криве изабрати неку другу опцију – нпр. несиметрична крива Вејбул функције уместо симетричне. Негативне инхибиције могу да представљају проблем нпр. код функције log-нормалне расподеле, и да захтевају да се употреби и алтернативна регресиона функција. Није препоручљиво да се тим негативним вредностима додели вредност нула или мала позитивна вредност јер се тиме искривљује расподела грешака. Понекад је примерено направити посебно прилагођавање одређених делова криве, нпр. део криве са ниском инхибицијом како би се добила процена вредности $EC_{low\ x}$. Из прилагођене једначине се израчунају („инверзном проценом" C = f–1 (Y)) карактеристичне процене тачака EC_x и документује најмање EC_{50} и једна или две процене $EC_{low\ x}$. Искуства са практичним испитивањима показују да је тест са алгама довољно прецизан да се по правилу може добити довољно тачна процена код инхибиције од 10%, под условом да су тачке података довољне – осим ако се при ниским концентрација јавља стимулација раста као фактор прилагођавања. Прецизност процене EC_{20} често је знатно већа од EC_{10} јер је EC_{20} обично смештен у приближно линеарном делу централне криве концентрација-одговор. Понекад се EC_{10} тешко тумачи због стимулације раста. Према томе, иако се EC_{10} по правилу може добити са довољном тачношћу, препоручује се да се уз њега увек наведе и EC_{20}.

Пондери

Варијанса експеримента уопштено није стална и обично укључује пропорционалну компоненту; стога је увек добро извршити пондерисану регресију.

$W_i = 1/Var(r_i)$

Многи регресиони програми нуде могућност пондерисане регресионе анализе применом пондера који су наведени у табели. Пондери се ради једноставности нормирају множењем са n/S w_i (n је број тачака података) тако да њихов збир буде 1.

Нормализовање одговора

Нормализовањем средњег одговора контрола јављају се неки темељни проблеми и добија прилично компликована структура варијансе. Дељењем одговора са средњим одговором контрола да би се добио проценат инхибиције уводи се додатна грешка која произлази из грешке средње контролне вредности. Осим у случају кад је та грешка занемарљиво мала, пондери регресије и границе поузданости исправљају се за коваријансу са контролом[17]. Овде је важна прецизност процене средње вредности контролних одговора како би се смањила укупна варијанса релативног одговора.

Напомена: индекс i се односи на концентрацију i, а индекс 0 на контролу.

Y_i = релативни одговор = $r_i/r_0 = 1 - I = f(C_i)$

уз варијансу:

$$Var(Y_i) = Var(r_i / r_0) \cong (\partial Y_i / \partial r_i)^2 \cdot Var(r_i) + (\partial Y_i / \partial r_0)^2 \times Var(r_0)$$

будући да је:

$$(\partial Y_i / \partial r_i) = 1 / r_0 \text{ и } (\partial Y_i / \partial r_0) = r_i / r_0^2$$

уз нормалну расподелу података и понављања m_i и m_0:

$Var(r_i) = \sigma^2/m_i$

укупна варијанса релативног одговора Y_i је према томе:

$Var(Y_i) = \sigma^2/(r_0^2\ m_i) + r_i^2 \times \sigma^2/r_o^4\ m_0$

Грешка средње контролне вредности је обрнуто пропорционална квадратном корену броја просечних контролних понављања и стога је понекад оправдано укључити податке из ранијих испитивања, чиме се може знатно смањити грешка. Алтернативни поступак је да се уместо нормирања података и прилагођавања апсолутних одговора укључујући податке о контролним одговорима, контролни одговор уведе као додатни параметар који се прилагођава нелинеарном регресијом. Ова метода уз уобичајену једначину регресије са 2 параметра захтева прилагођавање 3 параметра, тако да је потребно више тачака података него што је то случај код нелинеарне регресије података нормираних коришћењем унапред дефинисаног контролног одговора.

Инверзни интервали поузданости

Израчунавање интервала поверења нелинеарне регресије инверзном проценом је прилично сложено и не представља стандардну опцију у уобичајеним статистичким рачунарским програмским пакетима. Приближне границе поузданости могу се добити стандардним програмима нелинеарне регресије са репараметризацијом (Брус и Верстеег, 1992), што подразумева прераду математичке једначине тако да се на место параметара за процену уврсте жељене процене тачака, нпр. EC_{10} и EC_{50}. (Ако је функција I = f (α, β, концентрација), функцију f (α, β, концентрација) заменити идентичном функцијом g (EC_{10}, EC_{50}, концентрација), користећи дефиницијске односе f (α, β, EC_{10}) = 0,1 and f (α, β, EC_{50}) = 0,5.

Директније израчунавање добија се ако се задржи изворна једначина и употреби Тејлоров развој око средњих вредности r_i и r_0.

У последње време постале су популарне методе поновног узорковања са понављањем („bootstrap” методе). Те методе укључују процену емпиријске расподеле варијансе на основу измерених података и учесталог узорковања применом генератора случајних бројева.

Литература

1. Kooijman, S.A.L.M.; Hanstveit, A.O.; Nyholm, N. (1996): No-effect concentrations in algal growth inhibition tests. Water Research, 30, 1625-1632.

2. Bruce, R.D. and Versteeg, D.J.(1992) A Statistical Procedure for Modelling Continuous Ecotoxicity Data. Env. Toxicol. Chem.11, 1485-1494.

3. Andersen, J.S., Holst, H., Spliid, H., Andersen, H., Baun, A. & Nyholm, N. (1998): Continuous ecotoxicological data evaluated relative to a control response. Journal of Agricultural, Biological and Environmental Statistics, 3, 405-420

C.4. ОДРЕЂИВАЊЕ БРЗЕ БИОРАЗГРАДЉИВОСТИ

Део први

1. ОПШТА РАЗМАТРАЊА

1.1. УВОД

За тријажу хемикалија према брзој биоразградљивости у аеробном воденом медијуму користе се следеће методе испитивања:

1. Нестајање DOC (Метода C.4-A);

2. Модификована OECD тријажа – Нестајање DOC (Метода C.4-B);

3. Развијање методе C.4-B (Модификовани Стурм тест) (Метода C.4-C);

4. Манометријска респирометрија (Метода C.4-D);

5. Испитивање у затвореној боци (Метода C.4-E);

6. MITI испитивање (Метода C.4-F).

Општа и заједничка разматрања свих шест метода дата су у одељку 1. У одељку 2. до 7. дати су посебни детаљи за поједине методе. Прилози садрже дефиниције, формуле и упутства.

Међулабораторијско поређење, које је 1988. године спровео OECD, показало је да методе дају постојане резултате. Зависно од физичких својстава испитиване хемикалије, приоритет има једна или друга метода.

1.2. ДЕФИНИЦИЈЕ

Растворени кисеоник (Dissolved Oxygen, у даљем тексту: DO) јесте концентрација кисеоника растворeног у узорку воде, изражава се у mg/l.

Биохемијска потрошња кисеоника (у даљем тексту: БПК) јесте количина кисеоника коју утроше микроорганизми при разградњи испитиваног једињења, изражава се у грамима. БПК се такође изражава као грам потрошеног кисеоника по граму испитиваног једињења (видети Методу C.5. која је дата у овом прилогу).

Хемијска потрошња кисеоника (у даљем тексту: ХПК) јесте количина кисеоника потрошеног у току оксидације испитиваног једињења са врућим, киселим бихроматом; даје меру количине присутне супстанце која оксидише. Изражава се у грамима, и као грам кисеоника потрошеног по граму испитиваног једињења.

Растворени органски угљеник (Dissolved Organic Carbon, у даљем тексту: DOC) јесте органски угљеник присутан у раствору или онај који пролази кроз 0,45 µ филтер или остаје у супернатанту након центрифугирања на 40.000 m/s^2 (± 4000 g) у току 15 минута.

Теоретска потрошња кисеоника (Theoretical Oxygen Demand, у даљем тексту: ThOD) јесте укупна количина кисеоника (у mg) потребна да се хемикалија потпуно оксидише. Израчунава се из молекулске формуле (видети одељак 2.2. ове методе) и такође се изражава у mg потребног кисеоника по mg испитиваног једињења.

Теоретски угљен-диоксид (Theoretical Carbon Dioxide, у даљем тексту: ThC.4-B) јесте израчуната количина CO_2 (у mg), која настаје из познатог или измереног садржаја угљеника у испитиваном једињењу, када се оно у потпуности минерализује; такође се изражава у mg угљен-диоксида по mg испитиваног једињења.

Укупни органски угљеник (Total Organic Carbon, у даљем тексту: TOC) узорка јесте сума органског угљеника у раствору и оног у суспензији.

IC (Inorganic Carbon) јесте неорганski угљеник.

Укупни угљеник (Total Carbon, у даљем тексту: TC) јесте сума органског и неорганског угљеника присутног у узорку.

MITI (Ministry Of International Trade And Industry, Japan) јесте Министарство међународне трговине и индустрије Јапана.

Примарна биоразградња јесте промена у хемијској структури супстанце изазвана биолошким деловањем, која доводи до губитка специфичног својства те супстанце.

Потпуна биоразградња (аеробна) јесте ниво разградње који се постиже када испитивано једињење у потпуности искористе микроорганизми, при чему настају угљен-диоксид, вода, минералне соли и нове ћелијске структуре (биомасе).

Брзо биоразградљива супстанца јесте арбитрарна класификација хемикалија које су прошле одређене специфичне скрининг тестове за потпуну биоразградљивост. Ови тестови су толико стриктни да се сматра да се таква једињења брзо и потпуно биоразграђују у воденој животној средини при аеробним условима.

Инхерентно биоразградљива супстанца јесте класификација хемикалија за које, на основу испитивања биоразградљивости, постоји недвосмислен доказ да подлежу биоразградњи (примарној или потпуној).

Уклоњивост јесте подложност једињења уклањању путем биолошког пречишћавања отпадних вода, без негативног утицаја на уобичајени процес обраде отпадних вода. Брзо биоразградљива једињења се могу уклонити, али не и сва инхерентно биоразградљива једињења. Процесу уклањања могу допринети и абиотички процеси.

Време кашњења јесте време од инокулације, у испитивању нестанка, па до момента када разградња достигне ниво од најмање 10%. Време кашњења веома често варира и тешко се репродукује.

Време разградње наступа након времена кашњења и траје до момента када се достигне 90% од максималног нивоа разградње.

Десетодневни период је период од 10 дана који наступа одмах пошто се достигне ниво разградње од 10%.

1.3. ИЗБОР ОДГОВАРАЈУЋЕ МЕТОДЕ

За избор најприкладније методе, неопходни су подаци о растворљивости, напону паре и адсорпционим својствима хемикалије. Треба познавати хемијску структуру или формулу да би се израчунале теоретске вредности, односно проверити измерене вредности параметара, нпр. ThOD, ThC.4-B, DOC, TOC и ХПК (видети Део други ове методе).

Хемикалије чија растворљивост није нижа од 100 mg/l могу се испитивати свим методама ако нису испарљиве и ако се не адсорбују. За оне хемикалије које су слабо растворљиве у води, испарљиве или се адсорбују, погодне методе су назначене у Табели 1. Могући начини поступања са хемикалијама које су слабо растворљиве у води и које су испарљиве описан је у Делу трећем ове методе. Средње испарљиве хемикалије могу се испитати помоћу методе НестајањеDOC(Метода C.4-A), ако у испитиваним посудама (које треба да буду адекватно запушене) има довољно простора за гас. У овом случају, обавезно се поставља абиотичка контрола како би се узео у обзир и било какав физички губитак.

Табела 1: Примењивост метода испитивања

Метода испитивања	Аналитичка метода	Прикладност за супстанце:		
које су слабо растворљиве	које су испарљиве	које се адсорбују		
Нестајање DOC (Метода C.4-A)	Растворени органски угљеник	–	–	+/–
Модификована OECD тријажа –Нестајање DOC (Метода C.4-B)	Растворени органски угљеник	–	–	+/–
Развијање C.4-B (Метода C.4-C)	Респирометрија: развијање C.4-B	+	–	+
Манометријска респирометрија (Метода C.4-D)	Ман. респирометрија: потрошња кисеоника	+	+/–	+
Испитивање у затвореној боци(Метода C.4-E)	Респирометрија: растворени кисеоник	+/–	+	+
MITI испитивање (Метода C.4-F)	Респирометрија: потрошња кисеоника	+	+/–	+

За тумачење добијених резултата неопходни су подаци о степену чистоће или релативном уделу главних састојака испитиваног материјала, посебно кад су вредности резултата ниске или граничне.

Подаци о токсичном дејству испитиване хемикалије на бактерије (видети Део четврти ове методе) могу бити врло корисни при избору прикладних концентрација за испитивање. Наведени подаци могу бити од суштинске важности за

исправно тумачење ниских вредности биоразградње.

1.4. РЕФЕРЕНТЕ СУПСТАНЦЕ

За проверу поступка испитују се референтне хемикалије које испуњавају критеријуме брзе биоразградљивости и то тако што се упоредо са испитиваним поставе и посуде са референтном супстанцом.

Подесне хемикалије су анилин (свеже дестилован), натријум ацетат и натријум бензоат. Референтне хемикалије разграђују се применом ових метода чак и кад намерно није додат никакав инокулум.

Сугерисано је да треба тражити референтну хемикалију која је брзо биоразградљива, али захтева додавање инокулума. Предложен је калијум хидроген-фталат, али је неопходно да се прибави још доказа за ову супстанцу пре него што се она прихвати као референтна супстанца.

У респирометријским испитивањима, једињења који садрже азот могу утицати на потрошњу кисеоника услед нитрификације (видети Део други и пети ове методе).

1.5. ПРИНЦИП МЕТОДЕ

Раствор или суспензија испитиване супстанце у минералној подлози инокулише се и инкубира у аеробним условима у мраку или под дифузним осветљењем. Количина DOC у испитиваном раствору која је пореклом из инокулума је што нижа у поређењу са количином DOC из испитиване супстанце. Рачуна се и на ендогену активност инокулума. Упоредо се поставља слепа проба са инокулумом, али без испитиване супстанце, иако се ендогена активност ћелија у присуству супстанце не поклапа са оном у ендогеној контроли. Упоредо се испитује и референтна супстанца, како би се проверило извођење самог поступка.

Након разградње следи одређивање параметара попут DOC, продукција C.4-B и потрошња кисеоника, а мерења се спроводе у довољно честим временским интервалима како би се омогућило утврђивање почетка и краја биоразградње. Мерење се спроводи континуирано аутоматским респирометрима. DOC се понекад мери упоредо са неким другим параметром, и то на почетку или на крају испитивања. Процена примарне разградње испитиване супстанце, као и утврђивање концентрација међупроизвода који могу настати, може се утврдити помоћу специфичне хемијске анализе (обавезно у MITI испитивању).

Испитивање обично траје 28 дана. Испитивање се може завршити и пре истека 28 дана, односно чим крива биоразградње достигне плато у најмање три одређивања. Испитивање се може продужити после 28 дана када се по кривој може видети да је биоразградња започета, али плато није достигнут 28. дана.

1.6. КРИТЕРИЈУМИ КВАЛИТЕТА

1.6.1. Поновљивост

Због природе биоразградње и мешаних популација бактерија које се користе као инокулуми, испитивање се спроводи најмање у дупликату.

Што је већа почетна концентрација микроорганизама која се првобитно додаје у испитивану подлогу, то је мање одступање између реплика. Међулабораторијска испитивања су показала да могу постојати велика одступања међу резултатима добијених у различитим лабораторијама, мада се добро слагање обично постиже са лако биоразградљивим једињењима.

1.6.2. Прихватљивост испитивања

Испитивање се сматра валидним уколико на крају испитивања или на крају 10-дневног периода, зависно од случаја, разлика између крајњих вредности, добијених при достизању платоа разградње испитиване супстанце у поновљеним испитивањима, износи мање од 20% и ако је проценат разградње референтне супстанце достигао ниво за брзу биоразградљивости од 14 дана.

Ако ни један од ових услова није испуњен, испитивање се понавља. Услед искључивости методе, ниске вредности нужно не значе да испитивана супстанца није биоразградљива у условима животне средине, али указују да је потребно још рада да се установи биоразградљивост.

Ако се у испитивању токсичности, које укључује и испитивану супстанцу и референтну хемикалију, деси мање од 35% разградње (на основу DOC) или мање од 25% (на основу ThOD или ThC.4-B) у року од 14 дана, за испитивану хемикалију се може претпоставити да је инхибиторна (видети Део четврти ове методе). Серије испитивања се понављају, ако је могуће коришћењем ниже концентрације испитиване хемикалије, односно више концентрације инокулума, али не више од 30 mg/l чврсте фазе.

1.7. ОПШТЕ ПРОЦЕДУРЕ И ПРЕПАРАТИ

Општи услови који се примењују у испитивањима наведени су у Табели 2. Опрема и други услови испитивања специфични за сваку појединu методу испитивања наведени су у код описа конкретне методе.

Табела 2: Услови у току испитивања

Тест	Нестајање DOC	Развијање C.4-B	Манометријска респирометрија	Модиф. OECD скрининг тест	Испитивање у затвореној боци	MITI Испитивање

						(I)
Концентрација испитиване супстанце						
као mg/l			100		2-10	100
mg DOC/l	10-40	10-20		10-40		
mg ThOD/l			50-100		5-10	
Концентрација инокулума (у ћелијама/l, приближно)	≤ 30 mg/l SS или ≤ 100 ml ефлуента/l (10^7-10^8)			0,5 ml секунд. ефлуента/l (10^5)	≤ 5 ml ефлуента/l (10^4-10^6)	30 mg/l SS (10^7-10^8)
Концентрација елемената у минералној подлози (mg/l)						
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					најбоље 7,0
Температура	22°C ± 2°C					25°C ± 1°C
SS – суспендоване чврсте материје						

1.7.1. Вода за разблаживање

Користи се дејонизована или дестилована вода, која не садржи токсичне супстанце (нпр. јоне Cy^{2+}) у инхибиторним концентрацијама. Вода не сме садржати више од 10% органског угљеника који је унет са испитиваним материјалом. Висока чистоћа воде за разблаживање неопходна је да се елиминишу високе вредности у слепим пробама. Контаминација може настати због природно присутних нечистоћа, као и због смола јонских измењивача и производа разградње пореклом од бактерија и алги. У свакој испитиваној серији користи се вода из истог контејнера, претходно проверена помоћу DOC анализе. Таква провера није неопходна за испитивање у затвореној боци, али вода треба да има малу потрошњу кисеоника.

1.7.2. Основни раствори минералних материја

Да би се припремили испитивани раствори, припремају се основни раствори минералних материја у одговарајућим концентрацијама. Могу се користити следећи основни раствори (са различитим факторима разблажења) за методе: нестајањеDOC, модификовани OECD скрининг тест, развијање C.4-B, манометријска респирометрија испитивање у затвореној боци.

Фактори разблажења и припрема минералне подлоге специфична за MITI испитивање дати су у конкретној методи испитивања.

Основни раствори

Помоћу реагенаса аналитичке чистоће припремају се основни раствори:

1. растворити у води и допунити до 1 L(pH раствора да буде 7,4):

– 8,50 g KH_2PO_4(калијум-дихидрогенфосфат);

– 21,75 gK_2HPO_4(дикалијум-хидрогенфосфат);

– 33,40 gNa_2HPO_4´$2H_2O$ (динатријум-хидрогенфосфат дихидрат);

– 0,50 gNH_4Cl(амонијум-хлорид);

2. растворити у води и допунити до 1 L:

– 27,50 g $CaCl_2$(калцијум-хлорид, безводни) или

– 36,40 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (калцијум-хлорид дихидрат);

3. растворити у води и допунити до 1 L:

– 22,50 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (магнезијум-сулфат хептахидрат);

4. растворити у води и допунити до 1 L:

– 0,25 g $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (гвожђе(III)-хлорид хексахидрат).

Напомена: За избегавање припреме овог раствора непосредно пре употребе, додаје се једна капљица концентроване HCl или 0,4 g/l натријумове соли EDTA (етилендиаминтетра сирћетна киселина).

1.7.3. Основни раствори хемикалија

У зависности од потребе, раствори се од 1 g до 10 g испитиване или референтне хемикалије у дејонизованој води и допуни до 1 L након што растворљивост премаши вредност 1 g/l. У супротном, основни раствори се припремају у минералној подлози или се хемикалија додаје директно у минералну подлогу. За поступање са слабије растворљивим хемикалијама, видети Део трећи ове методе. У MITI испитивању (Метода C.4-F) не дозвољава се употреба растварача ни емулгатора.

1.7.4. Инокулуми

Инокулум може да потиче из разних извора, као што су: активни муљ, отпадна вода (дехлорисана), површинске воде и земљиште или из смеше ових извора. Ако се у испитивањима нестајања DOC, развијања C.4-B и манометријској респирометрији користи активни муљ, муљ се узима из постројења за пречишћавање отпадних вода или из уређаја лабораторијског типа, који прима претежно отпадну воду из домаћинстава. Показало се да је расипање резултата веће кад се користе инокулуми из других извора. За модификовани OECD скрининг тест и испитивање у затвореној боци, потребан је разређенији инокулум без фоликула муља, па се узима секундарни ефлуент из постројења за пречишћавање комуналних отпадних вода или уређаја лабораторијског типа. За MITI испитивање, инокулум се изводи из мешаних извора и дат је у конкретној методи испитивања.

1.7.4.1. Инокулум из активног муља

Свеж узорак активног муља узима се из аерационог базена постројења за пречишћавање отпадних вода или уређаја лабораторијског типа у којем се претежно обрађује комунална отпадна вода. Веће грубе честице по потреби се уклањају помоћу филтрације кроз фино сито, а муљ се након тога чува у аеробним условима.

Алтернативно, након уклањања већих честица, муљ се таложи или центрифугира (нпр. на 100 g у току 10 минута). Супернатант се баца. Муљ се може испрати у минералној подлози. Концентровани муљ се суспендује у минералној подлози да се добије концентрација од 3 g до 5 g суспендованих материја по литру и аерација се спроводи до употребе.

Муљ се узима из конвенционалног уређаја који исправно ради. Муљ испрати уколико се узима из великог уређаја за пречишћавање или се сматра да садржи инхибиторе. Након што се темељно промеша, ресуспендовани муљ се таложи или центрифугира, супернатант се баца, а испрани муљ се поновно ресуспендује у новој запремини минералне подлоге. Поступак се понавља све док се из муља не одстрани вишак супстрата или инхибитора.

Након што се постигне потпуна ресуспензија или са необрађеним муљем, узима се узорак непосредно пре одређивања суве масе суспендованих материја.

Следећа алтернатива је хомогенизација активног муља (од 3 g/l до 5 g/l суспендованих материја). Муљ се меша у механичкој мешалици у току 2 минута умереном брзином. Промешани муљ се таложи 30 минута или дуже, по потреби, а течни део који се користи као инокулум декантује се на 10 ml минералне подлоге.

1.7.4.2. Остали извори инокулума

Инокулум може да се узме из секундарног ефлуента из постројења за пречишћавање или уређаја лабораторијског типа који прима углавном отпадне воде из домаћинстава. Узме се свежи узорак и чува у аеробним условима у току транспорта. Узорак се таложи у току 1 сата или филтрира кроз груби филтер папир, а ефлуент или филтрат се декантује и чува у аеробним условима до употребе. Може се користити до 100 ml ове врсте инокулума по литру подлоге.

Извор инокулума могу да буду и површинске воде. У том случају узима се узорак одговарајуће површинске воде, нпр. из реке или језера, и чува у аеробним условима до употребе. По потреби, инокулум се концентрише филтрирањем или центрифугирањем.

1.7.5. Прекондиционирање инокулума

Инокулуми се могу прекондиционирати за испитиване услове, али се не могу преадаптирати за испитивану хемикалију. Прекондиционирање се састоји од аерације активног муља у минералној подлози или секундарном ефлуенту у току 5 до 7 дана на испитиваној температури. Прекондиционирање некада побољшава прецизност поступка испитивања, јер смањује вредности слепе пробе. Сматра се да није потребно прекондиционирати MITI инокулум.

1.7.6. Абиотичка контрола

По потреби се проверава могућа абиотичка разградња испитиване супстанце одређивањем уклањања DOC, потрошње

кисеоника и развијања угљен-диоксида у стерилним контролама које не садрже инокулум. Стерилизација се врши филтрацијом кроз мембрану промера од 0,2 µm до 0,45 µm или додавањем одговарајуће токсичне супстанце у одговарајућој концентрацији. Ако се користи мембранска филтрација, узорци се узимају асептички да се одржи стерилност. Тестови који мере биоразградњу као уклањање DOC, посебно са инокулумима активног муља, садрже и абиотичку контролу, која је инокулисана и отрована, осим у случају кад се претходно искључила адсорпција испитиване хемикалије.

1.7.7. Број посуда за испитивање

Број посуда у типичном начину испитивања дат је у појединачном испитивању.

Могу се користити следеће врсте посуда:

1) испитивана суспензија:

– садржи испитивану супстанцу и инокулум;

2) слепа проба са инокулумом:

– садржи само инокулум;

3) контрола поступка:

– садржи референтну супстанцу и инокулум;

4) стерилна абиотичка контрола:

– садржи испитивану супстанцу (видети одељак 1.7.6. ове методе);

5) контрола адсорпције:

– садржи испитивану супстанцу, инокулум и средство за стерилизацију;

6) контрола токсичности*:*

– садржи испитивану супстанцу, референтну супстанцу и инокулум.

Одређивање у испитиваној суспензији и слепој проби са инокулумом обавезно се раде упоредо. Саветује се да се и одређивања у осталим посудама раде упоредо.

Упоредо одређивање некада није могуће. Води се рачуна да се узме довољно узорака и изврши довољно мерења да се може проценити проценат уклањања након десетодневног периода.

1.8. ПОДАЦИ И ПРОЦЕНА

Кад се израчунава проценат разградње (Dт) користе се средње вредности двоструких мерења параметара у посуди за испитивање и слепој проби са инокулумом. Формуле за израчунавање дате су у појединим методама испитивања. Ток разградње приказује се графички и показује се десетодневни период. Израчунава се и приказује проценат уклањања који је постигнут на крају десетодневног периода и вредност на платоу или на крају испитивања, у зависности шта је примеренije.

У респирометријским испитивањима једињења која садрже азот могу утицати на потрошњу кисеоника због нитрификације (видети Део други и Део пети ове методе).

1.8.1. Разградња мерена помоћу одређивања DOC

Проценат разградње (D_t) у тренутку узимања узорка израчунава се посебно за сваку посуду која садржи испитивану супстанцу помоћу средњих вредности DOC из два мерења да би се могла проценити прихватљивост испитивања (видети одељак 1.6.2. ове методе). Проценат разградње се израчунава према једначини:

$$D_t = \left(1 - \frac{C_t - C_{bt}}{C_0 - C_{b0}}\right) \times 100$$

при чему:

Dт јесте проценат разградње у времену t;

C_0 јесте средња почетна концентрација DOC у инокулисаној подлози која садржи испитивану супстанцу (у mg DOC/l);

C_t јесте средња концентрација DOC у инокулисаној подлози која садржи испитивану супстанцу у времену t (у mg DOC/l);

C_{b0} јесте средња почетна концентрација DOC у минералној подлози инокулисаној слепом пробом (у mg DOC/l);

$C_{bт}$ јесте средња концентрација DOC у минералној подлози инокулисаном слепом пробом у времену t (у mg DOC/l).

Све концентрације мере се експериментално.

1.8.2. Разградња која се мери помоћу специфичне анализе

Примарна биоразградња, кад постоје подаци за специфичну анализу, израчунава се према формули:

$$D_t = \left(1 - \frac{S_b - S_a}{S_b}\right) \times 100$$

при чему:

Dт јесте проценат разградње у времену t које уобичајено износи 28 дана;

S_a јесте остатак испитиване супстанце у инокулисаној подлози на крају испитивања (mg);

S_b јесте остатак испитиване супстанце у слепој проби са водом/подлогом којој је додата само испитивана супстанца (mg).

1.8.3. Абиотичка разградња

Проценат абиотичке разградње, кад се користи абиотичка стерилна контрола, израчуна се помоћу формули:

$$\%\text{абиотичке разградње} = \frac{C_{s(0)} - C_{s(t)}}{C_{s(0)}} \times 100$$

при чему:

$C_{s(0)}$ јесте DOC концентрација у стерилној контроли на дан 0;

$C_{s(t)}$ јесте DOC концентрација у стерилној контроли на дан t.

1.9. ИЗВЕШТАЈ

Извештај о испитивању садржи податке о:

– испитиваним и референтним хемикалијама и њиховим чистоћама;

– условима у току испитивања;

– инокулуму: природа и место/места узимања узорка, концентрација и свака обрада прекондиционирањем;

– уделу и природи индустријског отпада присутног у отпадној води (ако је познато);

– дужини испитивања и температури;

– у случају слабо растворљивих испитиваних хемикалија, податке о припреми уколико је било,

– примењеној методи испитивања (дају се научни разлози и објашњења за сваку измену у поступку);

– обрасцу за унос података;

– свакој примећеној појави инхибиције;

– свакој примећеној абиотичкој разградњи;

– специфичним хемијским анализама, ако постоје;

– аналитичким подацима о међупроизводима, ако постоје;

– графичким приказима процента разградње у времену за одређену испитивану и референтну супстанцу; фаза одгоде, фаза разградње, десетодневни период и нагиб јасно се означавају (видети одељак 1.2. ове методе). Ако је испитивање задовољило критеријуме прихватљивости, средње вредности процента разградње у посудама које садрже испитивану супстанцу могу се употребити за израду графичког приказа;

– проценту уклањања након десетодневног периода, као и на платоу или на крају испитивања.

2. МЕТОДА ИСПИТИВАЊА НЕСТАЈАЊЕ DOC
(МЕТОДА C.4-A)

2.1. ПРИНЦИП МЕТОДЕ

Измерена запремина инокулисане минералне подлоге која садржи познату концентрацију испитиване супстанце (10 mg DOC/l до 40 mg DOC/l) као једини номинални извор органског угљеника аерише се у мраку или под дифузним осветљењем на температури од 22° C ± 2° C.

Након разградње следи DOC анализа у честим временским интервалима у току периода од 28 дана. Степен биоразградње израчунава се приказивањем концентрације уклоњеног DOC (коригован за онај DOC у контроли са инокулисаном слепом пробом) као процента од концентрације присутне на почетку. Степен примарне биоразградње може се израчунати и из допунске хемијске анализе спроведене на почетку и на крају инкубације.

2.2. ОПИС МЕТОДЕ

2.2.1. Опрема

Опрема за испитивање садржи:

– ерленмајер судове 250 ml до 2 L, у зависности од запремине потребне за DOC анализу;

– мешалицу у коју се могу причврстити ерленмајер судови (са или без аутоматске контроле температуре или се користе при константној собној температури), довољне снаге да одржи аеробне услове у свим посудама;

– уређај за филтрирање, са одговарајућим мембранама;

– DOC анализатор;

– уређај за одређивање раствореног кисеоника;

– центрифугу.

2.2.2. Припрема минералне подлоге

За припрему основног раствора видети одељак 1.8.2. ове методе.

Помеша се 10 ml основног раствора 1. са 800 ml воде за разблаживање, дода се 1 ml основних раствора 2. до 4. и допуни се до 1 L водом за разблаживање.

2.2.3. Припрема и прекондиционирање инокулума

Инокулум се може узети из разних врста извора: активног муља, комуналног ефлуента, површинских вода, земљишта или смеше истих.

Видети одељке 1.7.4, 1.7.4.1, 1.7.4.2. и 1.7.5. ове методе.

2.2.4. Припрема посуда за испитивање

Улије се 800 ml минералне подлоге у дволитарске ерленмајер судове и додају се довољне запремине основних раствора испитиваних и референтних супстанци у одвојене судове тако да се добије концентрација хемијског еквивалента 10 mgDOC/lдо 40 mg DOC/l. Провере се pH вредности и доведу, по потреби, до 7,4. Активни муљ или други извори инокулума (видети одељак 1.7.4. ове методе) инокулирају се у обичне судове тако да се добије коначна концентрација до највише 30 mg/l суспендованих материја. Припреме се и контроле инокулума у минералној подлози, али без испитиване или референтне хемикалије.

По потреби, једна посуда се користи за проверу могућег инхибиторног ефекта испитиване хемикалије инокулацијом раствора који садржи, у минералној подлози, сличне концентрације како испитиване, тако и референтне хемикалије.

Ако је потребно постави се још један стерилан обичан суд да се помоћу неинокулисаног раствора хемикалије провери да ли се хемикалија абиотички разграђује (видети одељак 1.7.6. ове методе).

Ако се сумња да се испитивана хемикалија значајно адсорбује на стакло, муљ, идр. направи се прелиминарна процена да се одреди вероватни опсег адсорпције и тако погодност методе испитивања за дате хемикалије (видети Табелу 1). Постави се обичан суд који садржи испитивану супстанцу, инокулум и средство за стерилизацију.

Запремина у свим обичним судовима се допуни до 1 L минералном подлогом и након мешања, узима се узорак из сваког обичног суда да се одреди почетна концентрација DOC (видети одељак 2.4. ове методе). Отвори обичних судова се покрију, нпр. алуминијском фолијом, али тако да се омогући слободна размена ваздуха између обичног суда и околне атмосфере. Затим се посуда стави на мешалицу да би се започело испитивање.

2.2.5. Број обичних судова у типичном испитивању

– испитивана суспензија: обични судови бр. 1 и 2;

– слепа проба са инокулумом: обични судови бр. 3 и 4;

– контрола поступка: обичан суд број 5.

Препоручено и по потреби:

– стерилна абиотичка контрола: обичан суд број 6;

– контрола адсорпције: обичан суд број 7;

– контрола токсичности: обичан суд број 8.

Видети одељак 1.7.7. ове методе.

2.2.6. Поступак

Током испитивања, концентрације DOC у сваком обичном суду одређују се у дупликату у познатим временским интервалима, довољно често да се може одредити почетак десетодневног периода и проценат уклањања на крају десетодневног периода. Узима се само минимална запремина испитиване суспензије потребна за свако одређивање.

Пре узимања узорака губитак настао испаравањем из тиквица по потреби се надокнађује додавањем воде за разблаживање (видети одељак 1.8.1. ове методе) у одговарајућој количини. Пре узимања узорка, подлога за културу темељно

се промеша и осигура се да материјал који прилеже уз зидове посуде буде растворен и суспендован. Филтрира се кроз мембране или центрифугира (видети одељак 2.4. ове методе) одмах након узимања узорка. Филтрирани или центрифугирани узорци анализирају се истог дана; у супротном, чувају се највише 48 сати на температури од 2° C до 4° C или на температури испод - 18° C у току дужег периода.

2.3. ПОДАЦИ И ИЗВЕШТАЈ

2.3.1. Обрада резултата

Израчуна се проценат разградње у времену t како је описано у одељку 1.8.1. ове методе (одређивање DOC) и, по избору, у одељку 1.8.2. ове методе (специфична анализа).

Резултати се записују на обрасцима за унос података.

2.3.2. Прихватљивост резултата

Видети одељак 1.6.2. ове методе.

2.3.3. Извештај

Видети одељак 1.9. ове методе.

2.4. ОБРАСЦИ ЗА УНОС ПОДАТАКА

Пример обрасца за унос података:

МЕТОДА ИСПИТИВАЊА НЕСТАЈАЊА DOC

1. ЛАБОРАТОРИЈА

2. ДАТУМ ПОЧЕТКА ИСПИТИВАЊА

3. ИСПИТИВАНА СУПСТАНЦА

Хемијски назив:

Концентрација основног раствора: ... mg/l као хемикалија

Почетна концентрација у подлози, до/према: ... mg/l као хемикалија

4. ИНОКУЛУМ

Извор:

Спроведена обрада:

Прекондиционирање, ако је спроведено:

Концентрација суспендованих материја у реакционој смеши: … mg/l

5. ОДРЕЂИВАЊЕ УГЉЕНИКА

Анализатор угљеника:

	Обичан суд број:		DOC након n дана (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Испитивана супстанца плус инокулум	1	a_1					
		a_2					
		a, средња $C_{a(t)}$					
	2	b_1					
		b_2					
		b, средња $C_{b(t)}$					
Слепа проба са инокулумом без испитиване супстанце	3	C_1					
		C_2					
		C, средња $C_{c(t)}$					
	4	d_1					
		d_2					
		d, средња $C_{d(t)}$					
	$C_{M(t)} = \frac{C_{c(0)} - C_{d(t)}}{2}$						

6. ПРОЦЕНА НЕОБРАЂЕНИХ ПОДАТАКА

Обичан суд број:		% разградње након n дана				
		0	n_1	n_2	n_3	n_x
1	$D_1 = \left(1 - \frac{C_{a(t)} - C_{M(t)}}{C_{a(0)} - C_{M(0)}}\right) \times 100$	0				
2	$D_2 = \left(1 - \frac{C_{a(t)} - C_{M(t)}}{C_{a(0)} - C_{M(0)}}\right) \times 100$	0				
Средња вредност*	$D = \frac{(D_1 + D_2)}{2}$	0				
* Не сме се користити средња вредност ако између D_1 и D_2 постоји значајна разлика						

Напомена: За референтне хемијске контроле и контроле токсичности могу се користити слични обрасци.

7. АБИОТИЧКА КОНТРОЛА (по избору)

	Време (у данима)	
	0	t
DOC концентрација (mg/l) у стерилној контроли	$C_{s(0)}$	$C_{s(t)}$

$$\%\text{абиотичке разградње} = \frac{C_{s(0)} - C_{s(t)}}{C_{s(0)}} \times 100$$

8. СПЕЦИФИЧНА ХЕМИЈСКА АНАЛИЗА (по избору)

	Резидуална количина испитиване супстанце на крају испитивања (mg/l)	% примарне разградње
Стерилна контрола	S_b	
Инокулисана испитивана подлога	S_a	

3. МОДИФИКОВАНИ OECD СКРИНИНГ ТЕСТ (МЕТОДА C.4-B)

3.1. ПРИНЦИП МЕТОДЕ

Измерена запремина минералне подлоге која садржи познату концентрацију испитиване супстанце (10 mg DOC/l до 40 mg DOC/l) као једини номинални извор органског угљеника инокулира се са 0,5 ml ефлуента по литру медијума. Смеша се аерише у мраку или под дифузним осветљењем на 22° C ± 2° C.

Након разградње следи DOC анализа у честим размацима у току 28 дана. Степен биоразградње израчунава се приказивањем концентрације уклоњеног DOC (коригованог за онај у контроли коју представља инокулисана слепа проба) као проценат од концентрације присутне на почетку. Степен примарне биоразградње може се израчунатии из додатне хемијске анализе која се ради на почетку и на крају инкубације.

3.2. ОПИС МЕТОДЕ

3.2.1. Опрема

Опрема за испитивање садржи:

– ерленмајер судове запремине од 250 ml до 2 L, у зависности од запремине потребне за DOC анализу;

– мешалицу (у коју се могу причврстити ерленмајер судови са аутоматском контролом температуре или без, ако се користе при константној собној температури) довољне снаге да одржи аеробне услове у свим посудама;

– уређај за филтрирање, са одговарајућим мембранама;

– DOC анализатор;

– уређај за одређивање раствореног кисеоника;

– центрифугу.

3.2.2. Припрема минералне подлоге

За припрему основног раствора, видети одељак 1.7.2. ове методе.

Помешати 10 ml основног раствора 1. са 80 ml воде за разблаживање, додати 1 ml основног раствора 2. до 4. и допунити водом за разблаживање до укупне запремине од 1 L.

У овом поступку се користи само 0,5 ml/l ефлуента као инокулум, па би подлогу требало обогатити елементима у траговима и факторима раста. То се постиже додатком 1 ml сваког од следећих раствора по литру готове подлоге:

1. Раствор елемената у траговима:

– 39,9 mg $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ (манган-сулфат тетрахидрат);

– 57,2 mg H_3BO_3(борна киселина);

– 42,8 mg $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (цинк-сулфат хептахидрат);

– 34,7 mg $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$ (амонијум хептамолибдат);

– 100,0 mg $FeCl_3$ и EDTA (хелат гвожђа).

Растворити у води за разблаживање и допунити водом до укупно 1.000 ml.

2. Раствор витамина:

– екстракт квасца 15,0 mg.

Растворити екстракт квасца у 100 ml воде. Стерилисати филтрацијом кроз мембрану од 0,2 µ или припремити непосредно пред употребу.

3.2.3. Припрема и прекондиционирање инокулума

Инокулум се узима из секундарног ефлуента из постројења за пречишћавање или уређаја лабораторијског типа који прима претежно отпадну воду из домаћинстава. Видети одељке 1.7.4.2. и 1.7.5. ове методе.

Користи се 0,5 ml по литру минералног медијума.

3.2.4. Припрема обичних судова

Сипа се 800 ml минералне подлоге у дволитарске ерленмајер судове и дода се довољно велика запремина основних раствора испитиване и референтне супстанце у одвојене обичне судове да се добије концентрација хемијског еквивалента 10 mg DOC/l до 40 mg DOC/l. Провери се pH вредност и по потреби доведе на 7,4. Излазни ефлуент инокулише се у обичне судове у концентрацији од 0,5 ml по литру (видети одељак 1.7.4.2. ове методе). Припреме се и контроле инокулума у

минералној подлози, али без испитиване или референтне хемикалије.

По потреби, користи се једна посуда да се провери могући инхибиторни ефекат испитиване хемикалије инокулацијом раствора који садржи, у минералној подлози, сличне концентрације и испитиване и референтне хемикалије.

Ако је потребно, постави се још један стерилан обичан суд да се помоћу неинокулисаног раствора хемикалије провери да ли се испитивана хемикалија разграђује абиотички (видети одељак 1.8.6. ове методе).

Ако се сумња да се испитивана хемикалија значајно адсорбује на стакло, муљ, итд. ради се прелиминарна процена да се одреди вероватни опсег адсорпције и тиме погодност методе за испитивање те хемикалије (видети Табелу 1). Постави се обичан суд који садржи испитивану супстанцу, инокулум и средство за стерилизацију.

У све обичне судове додаје се минерална подлога до запремине од 1 L. Након мешања, узима се узорак из сваког појединог обичног суда да се одреди почетна концентрација DOC (видети одељак 2.4. ове методе). Покрију се отвори обичних судова, нпр. са алуминијском фолијом, али тако да се омогући размена ваздуха између обичног суда и околне атмосфере. Затим се посуде стављају на мешалицу и започиње се са испитивањем.

3.2.5. Број обичних судова у типичном испитивању

Редни број обичних судова:

– испитивана суспензија: обични судови бр. 1 и 2;

– слепа проба са инокулумом: обични судови бр. 3 и 4;

– контрола поступка: обичан суд број 5.

Препоручено и по потреби:

– стерилна абиотичка контрола: обичан суд број 6;

– контрола адсорпције: обичан суд број 7;

– контрола токсичности: обичан суд број 8.

Видети одељак 1.7.7. ове методе.

3.2.6. Поступак

Током читавог испитивања, концентрације DOC одређују се у сваком обичном суду у дупликату у познатим временским интервалима, довољно често да се може одредити почетак десетодневног периода и проценат уклањања на крају десетодневног периода. Узима се само минимална запремина испитиване суспензије потребне за свако одређивање.

Пре узимања узорака запремина која се изгубила испаравањем из тиквица надокнађује се по потреби додавањем воде за разблаживање (видети одељак 1.7.1. ове методе) у одговарајућој количини. Пре узимања узорка, подлога се темељно промеша и пази се да материјал који прилеже уз зидове посуде буде растворен или суспендован. Одмах након узимања, узорак се мембрански филтрира или центрифугира (видети одељак 2.4. ове методе). Филтрирани или центрифугирани узорци анализирају се истог дана; у супротном, чувају се на 2° C до 4° C у току највише 48 сати или на температури мањој од – 18° C у току дужег периода.

3.3. ПОДАЦИ И ИЗВЕШТАЈ

3.3.1. Обрада резултата

Израчуна се проценат разградње у времену t како је дато у одељку 1.8.1. ове методе (DOC одређивање) и по избору, у одељку 1.8.2. ове методе (специфична анализа).

Резултати се записују на обрасцима за унос података.

3.3.2. Прихватљивост резултата

Видети одељак 1.6.2. ове методе.

3.3.3. Извештај

Видети одељак 1.9. ове методе.

3.4. ОБРАСЦИ ЗА УНОС ПОДАТАКА

Пример обрасца за унос података:

МОДИФИКОВАНАОЕСDТРИЈАЖА

1. ЛАБОРАТОРИЈА

2. ДАТУМ ПОЧЕТКА ИСПИТИВАЊА

3. ИСПИТИВАНА СУПСТАНЦА

Хемијски назив:

Концентрација основног раствора: ... mg/l као хемикалија

Иницијална концентрација у подлози, до: ... mg/l као хемикалија

4. ИНОКУЛУМ

Извор:

Обављена обрада:

Прекондиционирање, ако је обављено:

Концентрација суспендованих материја у реакционој смеши: … mg/l

5. ОДРЕЂИВАЊЕ УГЉЕНИКА

Анализатор угљеника:

	Обичан суд број:		DOC након n дана (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Испитивана супстанца плус инокулум	1	a_1					
		a_2					
		a, средња $C_{a(t)}$					
	2	b_1					
		b_2					
		b, средња $C_{b(t)}$					
Слепа проба са инокулумом без испитиване супстанце	3	C_1					
		C_2					
		C, средња $C_{c(t)}$					
	4	d_1					
		d_2					
		d, средња $C_{d(t)}$					
	$C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} - C_{d(t)}}{2}$						

6. ПРОЦЕНА НЕОБРАЂЕНИХ ПОДАТАКА

Обичан суд број		% разградње након n дана				
		0	n_1	n_2	n_3	n_x
1	$D_1 = \left(1 - \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_{a(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$	0				
2	$D_2 = \left(1 - \frac{C_{b(t)} - C_{bl(t)}}{C_{b(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$	0				
Средња вредност (*)	$D = \frac{(D_1 + D_2)}{2}$	0				
(*) Не сме се користити средња вредност ако између D_1 и D_2 постоји значајна разлика						

Напомена: За референтне хемијске контроле и контроле токсичности могу се користити слични обрасци.

7. АБИОТИЧКА КОНТРОЛА (по избору)

	Време (у данима)	
	0	t
DOC концентрација (mg/l) у стерилној контроли	$C_{s(0)}$	$C_{s(t)}$

$$\%\ \text{абиотичкеразградње} = \frac{C_{s(0)} - C_{s(t)}}{C_{s(0)}} \times 100$$

8. СПЕЦИФИЧНА ХЕМИЈСКА АНАЛИЗА (по избору)

	Резидуална количина испитиване супстанце на крају испитивања (mg/l)	% примарне разградње
Стерилна контрола	S_b	
Инокулисана испитивана подлога	S_a	

4. РАЗВИЈАЊЕ МЕТОДЕ C.4-B (МЕТОДА C.4-C)

4.1. ПРИНЦИП МЕТОДЕ

Измерена запремина инокулисане минералне подлоге која садржи познату концентрацију испитиване хемикалије (10 mg до 20 mg DOC или TOC/l) као једини номинални извор органског угљеника аерише се проласком ваздуха без угљен-диоксида при контролисаној брзини у мраку или под дифузним осветљењем. Разградња се прати у току 28 дана одређивањем произведеног угљен-диоксида, који се хвата баријум или натријум хидроксидом и мери титрацијом резидуалног хидроксида или као неорганског угљеника. Количина угљен-диоксида произведена из испитиване хемикалије (кориговано за ону количину изведену из слепе пробе са инокулумом) изражава се као проценат ThC.4-B. Степен биоразградње може се израчунатии из додатне DOC анализе која се обавља на почетку и на крају инкубације.

4.2. ОПИС МЕТОДЕ

4.2.1. Опрема

Опрема за испитивање садржи:

– обичне судове, од 2 L до 5 L, сваки опремљен са цевчицом за ваздух која досеже скоро до дна посуде и отвором;

– магнетне мешалице, ако се испитују слабо растворљиве хемикалије;

– боце за апсорпцију гасова;

– уређај за контролу и мерење протока ваздуха;

– опрему за уклањање угљен-диоксида, тј. за припрему ваздуха који не садржи угљен-диоксид; алтернативно се може користити смеша кисеоника без C.4-B и азота без C.4-B, из гасних цилиндара, у правој пропорцији (20% O_2 : 80% H_2);

– уређај за одређивање угљен-диоксида, или титриметријски или помоћу неког типа анализатора неорганског угљеника;

– уређај за мембранску филтрацију (није обавезан);

– DOC анализатор (није обавезан).

4.2.2. Припрема минералне подлоге

За припрему основног раствора видети одељак 1.8.2. ове методе.

Помеша се 10 ml основног раствора 1. са 800 ml воде за разблаживање, дода се 1 ml основног раствора 2. до 4. и допуни водом за разблаживање до укупно 1 L.

4.2.3. Припрема и прекондиционирање инокулума

Инокулум се може узети из разних извора: активног муља; ефлуената отпадне воде; површинских вода, земљишта или из смеше истих.

Видети одељке 1.7.4, 1.7.4.1, 1.7.4.2. и 1.7.5. ове методе.

4.2.4. Припрема обичних судова

Као пример, доле наведене запремине и тежине показују вредности које се користе за петолитарске обичне судове које садрже 3 L суспензије. Ако се користе мање запремине, вредности се прилагођавају, с тим да се створени угљен-диоксид тачно мери.

У сваки петолитарски обичан суд сипа се 2.400 ml минералне подлоге. Дода се одговарајућа запремина припремљеног активног муља (видети одељак 1.7.4.1. и 1.7.5. ове методе) тако да се у коначној инокулисаној мешавини од 3 L добије

концентрација суспендованих материја од највише 30 mg/l. Алтернативно, прво се може разредити припремљени муљ да се формира суспензија од 500 mg/l до 1.000 mg/l у минералној подлози пре додавања узорка – тако да се добије концентрација од 30 mg/l. Поступак обезбеђује већу прецизност. Могу се користити и остали извори инокулума (видети одељак 1.7.4.2. ове методе).

Инокулиране смеше аеришу се ваздухом који не садржи C.4-B у току ноћи, да се систем прочисти од угљен-диоксида.

Испитивани материјал и референтна супстанца додају се одвојено, као познате запремине основних раствора, у обичним судовима у дупликату, тако да финалне концентрације, којима су допринеле додате хемикалије, буду од 10 mg до 20 mg DOC или TOC/l.У неке обичне судове не додају се хемикалије и оне служе као контрола инокулума. Слабо растворљиве испитиване супстанце додају се директно у обичне судове на бази тежине или запремине, као што је описано у Делу трећем ове методе.

По потреби, један обичан суд се користи за проверу могућег инхибиторног ефеката испитиване хемикалије тако што се додају и испитивана и референтна хемикалија у истим концентрацијама у којима су присутне у другим обичним судовима.

По потреби, један стерилан обичан суд користи се како би се употребом неинокулисаног раствора хемикалије проверило да ли се испитивана хемикалија разграђује абиотички (видети одељак 1.8.6. ове методе). Стерилише се додавањем токсичне супстанце у одговарајућој концентрацији.

Суспензија се у свим обичним судовима допуни до запремине од 3 L додавањем минералне подлоге претходно аерисане ваздухом који не садржи C.4-B. По избору, могу се извући узорци за анализу DOC (видети Део други ове методе), односно узорци за специфичну анализу. Апсорпционе боце спајају се са отворима за ваздух на обичним судовима.

Ако се користи баријум-хидроксид, споје се три апсорпционе боце, од којих свака садржи 100 ml раствора баријум-хидроксида од 0,0125 M, у серији са сваким петолитарским обичним судом. Наведени раствор не садржи исталожени сулфат ни карбонат и његова јачина се одређује непосредно пре употребе. Ако се користи натријум хидроксид, спајају се две клопке, од којих друга има улогу контроле, да се покаже да се сав угљен-диоксид апсорбовао у првој. Погодне су апсорпционе боце са гуменим чепом. У сваку боцу се дода по 200 ml 0,05 M натријум-хидроксида, што је довољно да се апсорбује укупна количина угљен-диоксида која се развије кад испитивана хемикалија буде потпуно разграђена. Раствор натријум-хидроксида, чак и кад је свеже припремљен, садржи трагове карбоната, што се коригује одузимањем вредности карбоната у слепој проби.

4.2.5. Број обичних судова у типичном испитивању

Редни број обичних судова:

– испитивана суспензија: обични судови бр. 1 и 2;

– слепа проба са инокулумом: обични судови бр. 3 и 4;

– контрола поступка: обичан суд број 5.

Препоручено и по потреби:

– стерилна абиотичка контрола: обичан суд број 6;

– контрола адсорпције: обичан суд број 7;

– контрола токсичности: обичан суд број 8.

Видети одељак 1.7.7. ове методе.

4.2.6. Поступак

Испитивање започиње пропуштањем мехурића ваздуха који не садржи C.4-B кроз суспензије брзином од 30 ml/min до 100 ml/min. Периодично се узимају узорци апсорбента угљен диоксида за анализу садржаја C.4-B. Током првих 10 дана препоручује се да се анализа уради сваки други или трећи дан, а затим сваки пети дан све до 28. дана, тако да се може идентификовати десетодневни период.

Двадесетосмог дана, узимају се узорци (по избору) за DOC, односно за специфичну анализу, мери се pH суспензије и додаје 1 ml концентроване хлороводичне киселине у сваки обичан суд. Преко ноћи обични судови се аеришу да се извуче угљен-диоксид присутан у испитиваним суспензијама. Двадесетдеветог дана ради се последња анализа створеног угљен-диоксида.

На дане мерења C.4-B, одваја се апсорбер са баријум хидроксидом који је најближи обичном суду и хидроксидни раствор се титрира са 0,05 M HCl, при чему се фенолфталеин користи као индикатор. Преостали апсорбери се помичу за једно место ближе обичном суду и поставља се нови апсорбер који садржи 100 ml свежег 0,0125 M баријум хидроксида на најдаљи крај серије. Титрације се раде по потреби, нпр. кад се види велика преципитација у првој клопци, а пре него постане видљива у другој, или најмање једном недељно. Алтернативно се може, са NaOH као апсорбентом, пипетом извући мали узорак (у зависности од карактеристика употребљеног анализатора угљеника) раствора натријум хидроксида у апсорберу ближем обичном суду. Узорак се инјектира директно у IC део анализатора угљеника за анализу насталог угљен-диоксида.

Садржај друге клопке анализира се на крају испитивања, ради корекције за евентуални пренети угљен-диоксид.

4.3. ПОДАЦИ И ИЗВЕШТАЈ

4.3.1. Обрада резултата

Кад се иститрира, количина C.4-B ухваћеног у апсорберу изражава се помоћу формуле:

$$mgCO_2 = (100 \times C_B - 0.5 \times V \times C_A) \times 44$$

при чему:

V јесте запремина HCl употребљене за титрацију 100 ml у апсорберу (ml);

C_B јесте концентрација раствора баријум хидроксида (M);

C_A јесте концентрација раствора хлороводичне киселине (M).

Ако C_B износи 0,0125 M и C_A износи 0,05 M, титрација за 100 ml баријум хидроксида јесте 50 ml, а масу C.4-B даје израз:

$$\frac{0,05}{2} \times 44 \times \text{ml титриране HCL} = 1,1 \times \text{ml HCL}$$

У овом случају, за превођење запремине иститроване HCl у mg произведеног C.4-B примењује се фактор 1,1.

Израчунају се масе C.4-B произведеног из чистог инокулума и инокулума са испитиваном хемикалијом помоћу одговарајућих титрацијских вредности, а добијена разлика је маса C.4-B произведеног само из испитиване хемикалије.

На пример, ако сам инокулум даје титрацију од 48 ml, а инокулум са испитиваном хемикалијом даје 45 ml:

C.4-Виз инокулума = 1,1 x (50 – 48) = 2,2 mg

C.4-Виз инокулума са испитиваном хемикалијом = 1,1 x (50 – 45) = 5,5 mg

Маса C.4-B произведеног из испитиване хемикалије износи 3,3 mg.

Проценат биоразградње израчунава се формулом:

$$\%\ \text{разградње} = \frac{\text{mg произведеног C.4} - \text{B} \times 100}{\text{ThC.4} - \text{B} \times \text{mg додате испитиване хемикалије}}$$

или формулом:

$$\%\ \text{разградње} = \frac{\text{mg произведеног C.4} - \text{B} \times 100}{\text{mg TO додатог приликом испитивања} \times 3.67}$$

уз 3,67 као фактор конверзије (44/12) за угљеник у угљен-диоксид.

Да би се добио проценат разградње након било ког временског интервала, дода се проценат вредности ThC.4-B израчунате за сваки поједини дан, до времена на који се радило мерење.

За апсорбере од натријум хидроксида, израчуна се количина произведеног угљен-диоксида, изражена као IC (mg), множењем концентрације IC у апсорбенту са запремином апсорбента.

Проценат разградње израчунава се формулом:

$$\%\ \text{ThC.4} - \text{B} = \frac{(\text{mg IC обичног суда} - \text{mg IC слепе пробе})}{(\text{MG TOC додат као испитивана хемикалија})}$$

Уклањање DOC (по избору) се израчуна на начин из одељка 1.8. ове методе. Резултати се записују у обрасцима за унос података.

4.3.2. Прихватљивост резултата

Садржај IC у суспензији испитиване хемикалије у минералној подлози на почетку испитивања износи мање од 5% TC, а укупно развијени C.4-B у слепој проби са инокулумом на крају испитивања не сме нормално да премаши 40 mg/l подлоге. Ако се добију вредности изнад 70 mg C.4-B/l, подаци и испитивана техника се критички испитују.

Видети одељак 1.6.2. ове методе.

4.3.3. Извештај

Видети одељак 1.9. ове методе.

4.4. ОБРАСЦИ ЗА УНОС ПОДАТАКА

Пример обрасца за унос података:

МЕТОДА ИСПИТИВАЊА РАЗВИЈАЊА C.4-B

1. ЛАБОРАТОРИЈА

2. ДАТУМ ПОЧЕТКА ИСПИТИВАЊА

3. ИСПИТИВАНА СУПСТАНЦА

Хемијски назив:

Концентрација основног раствора: ... mg/l као хемикалија

Почетна концентрација у подлози: ... mg/l као хемикалија

Укупни C додат у обичну посуду : ... mg C

ThC.4-B: … mg C.4-B

4. ИНОКУЛУМ

Извор:

Спроведена обрада:

Прекондиционирање, ако је спроведено:

Концентрација суспендованих материја у реакционој смеши: ... mg/l

Време (дани)	Развијени C.4-B Тест (mg)		Развијени C.4-B Слепа проба (mg)		Кумулативни развијени C.4-B (mg) (тест минус средња вредност слепе пробе)		ThC.4-B $\frac{\text{кумулативни } CO_2}{ThCO_2} \times 100$		
	1/2	средња вредност	3/4	средња вредност	1	2	1	2	средња вредност
0									
n_1									
n_2									
n_3									
28									

Напомена: Слични формати могу се користити за референтне хемијске контроле и контроле токсичности.

6. АНАЛИЗА УГЉЕНИКА (ПО ИЗБОРУ)

Анализатор угљеника

Време (у данима)	Слепа проба (mg/l)	Тест хемикалија (mg/l)
0	$C_{b(0)}$	C_0
28 (*)	$C_{b(t)}$	C_t
(*) или на крају инкубације		

$$\% \text{ уклоњеног DOC} = \left(1 - \frac{C_t - C_{bt}}{C_0 - C_{b0}}\right) \times 100$$

7. АБИОТИЧКА РАЗГРАДЊА (по избору)

$$\% \text{ абиотичкеразградње} = \frac{CO_2 \text{ настао у обичној посуди након 28 дана[mg]}}{ThCO_2[mg]} \times 100$$

5. МАНОМЕТРИЈСКА РЕСПИРОМЕТРИЈА (МЕТОДА C.4-D)

5.1. ПРИНЦИП МЕТОДЕ

Одмерена запремина инокулисане минералне подлоге, која садржи познату концентрацију испитиване хемикалије (100 mg/l испитиване супстанце, да се добије најмање 50 mg ThOD/lдо 100 mg ThOD/l) као једини номинални извор органског угљеника, меша се у затвореном обичном суду на сталној температури (± 1° C или мање) не дуже од 28 дана. Потрошња кисеоника одређује се или помоћу мерења количине кисеоника (произведеног електролизом) потребног да се одржи константна запремина гаса у обичном суду респирометра или из промена у запремини или притиску (или комбинацијом ова два начина) у опреми. Развијени угљен-диоксид апсорбује се у раствору калијум хидроксида или другог погодног апсорбента. Количина кисеоника коју потроши испитивана хемикалија (кориговано за потрошњу инокулума из слепе пробе, ради се упоредо) изражава се као проценат ThOD или ХПК. По избору, примарна биоразградња може се израчунатии из додатне специфичне анализе урађене на почетку и на крају инкубације, а крајња биоразградња помоћу DOC анализе.

5.2. ОПИС МЕТОДЕ

5.2.1. Опрема

Опрема за испитивање садржи:

– погодни респирометар;

– контролу температуре, која се одржава унутар ± 1° C или мање;

– систем за мембранску филтрацију (није обавезан);

– анализатор угљеника (није обавезан).

5.2.2. Припрема минералне подлоге

За припрему основног раствора, видети одељак 1.7.2. ове методе.

Помеша се 10 ml основног раствора 1 са 800 ml воде за разблаживање, дода се 1 ml основног раствора 2 до 4 и допуни до запремине од 1 L са водом за разблаживање.

5.2.3. Припрема и прекондиционирање инокулума

Инокулум се може узети из разних врста извора: активираног муља, ефлуента отпадних вода, површинских вода и земљишта или смеше истих.

Видети одељке 1.7.4, 1.7.4.1, 1.7.4.2. и 1.7.5. ове методе.

5.2.4. Припрема обичног суда

Раствори испитиваних и референтних хемикалија припремају се у одвојеним серијама, у минералној подлози еквивалентно концентрацији обично од 100 mg хемикалије/l (дајући најмање 50 mg ThOD/lдо 100 mg ThOD/l), помоћу основних раствора.

ThOD се израчунава на основу награђених соли амонијака, осим у случају кад се очекује нитрификација. Тада се израчунавање базира на стварању нитрата (видети одељак 2.2. ове методе).

Одреде се pH вредности и по потреби сведу на вредности од 7,4 ± 0,2.

Слабо растворљиве супстанце се додају у каснијој фази.

Ако се одређује токсичност испитиване хемикалије, припрема се још један раствор у минералној подлози која садржи и испитивану и референтну хемикалију у истим концентрацијама као и појединачни раствори.

Ако се мери физичко-хемијска потрошња кисеоника, припрема се раствор испитиване хемикалије у концентрацији обично од 100 mg ThOD/l која је претходно била стерилисана додатком одговарајуће токсичне супстанце (видети одељак 1.7.6. ове методе).

Потребна запремина сваког од раствора испитиване и референтне хемикалије сипа се у најмање два обична суда. У остале обичне судове додаје се само минерална подлога (за контролу инокулума) и по потреби, помешани раствори испитиване/референтне супстанце и стерилни раствор.

Ако је испитивана супстанца слабо растворљива, у овој фази се она додаје директно на основу масе или запремине, или се обрађује на начин из одељка 3. ове методе. У одељке C.4-B апсорбера додају се калијум-хидроксид, зрнца натријум и калцијум-хидроксида (креч) или други апсорбенси.

5.2.5. Број обичних судова у типичном испитивању

Редни број обичних судова:

– испитивана суспензија: обични судови бр. 1 и 2;

– слепа проба са инокулумом: обични судови бр. 3 и 4;

– контрола поступка: обичан суд број 5.

Препоручено и по потреби:

– стерилна контрола: обичан суд број 6;

– контрола токсичности: обичан суд број 7.

Видети одељак 1.7.7. ове методе.

5.2.6. Поступак

Након што се у посудама постигне жељена температура, у одговарајуће посуде се инокулише припремљени активни муљ или инокулум из другог извора да се добије концентрација суспендованих материја не већа од 30 mg/l. Састави се опрема, покрене мешалица, провери се изолација ваздуха и започне са мерењем потрошње кисеоника. Обично није потребан додатни опрез осим што се раде обавезна очитавања и свакодневно проверава да је температура тачна и да мешалица ради.

Потрошња кисеоника израчунава се из очитавања обављених у редовним и честим интервалима, помоћу поступака које је дао произвођач опреме. На крају инкубације, обично од 28 дана, измери се pH вредност садржаја обичних судова, посебно ако је потрошња кисеоника ниска или већа од $ThODNH_4$ (за једињења која садрже азот).

По потреби се узимају узорци из респирометријских обичних судова, на почетку и на крају, за анализу DOC или специфичне хемикалије (видети одељак 2.4. ове методе). Кад се први пут узимају узорци, потребно је знати запремину тест суспензије која је преостала у обичном суду. Кад тест супстанца која садржи азот троши кисеоник, одређује се пораст концентрације нитрита или нитрата у току 28 дана и израчуна се корекција за кисеоник потрошен у нитрификацији (видети Део пети ове методе).

5.3. ПОДАЦИ И ИЗВЕШТАЈ

5.3.1. Обрада резултата

Кисеоник (mg) који је потрошила испитивана хемикалија у одређеном временском периоду (коригован за онај помоћу контроле слепе пробе са инокулумом у истом временском периоду) подели се са масом употребљене испитиване хемикалије. Тиме се добије БПК изражен као mg кисеоника по mg испитиване хемикалије, то јест:

$$\text{БПК} = \frac{\text{mg потрошња} O_2 \text{ испитиване хемикалије} - \text{mg потрошња} O_2 \text{ слепе пробе}}{\text{mg испитиване хемикалије у обичном суду}}$$

$$= \text{mg } O_2 \text{ по mg испитиване хемикалије}$$

Проценат биоразградње израчунава се помоћу једначине:

$$\%\ \text{разградње} = \%\text{ThOD} = \frac{\text{БПК } (\text{mg } O_2/\text{mg испитиване хемикалије})}{\text{ThOD}(\text{mg } O_2/\text{mg испитиване хемикалије})} \times 100$$

или једначине:

$$\%\ \text{ХПК} = \frac{\text{БПК}(\text{mg } O_2/\text{mg испитиване хемикалије})}{\text{ХПК}(\text{mg } O_2/\text{mg испитиване хемикалије})} \times 100$$

Ова два поступка не дају обавезно исте вредности. Предност се даје првом поступку.

За испитивање супстанци које садрже азот, користи се одговарајући ThOD (NH_4 или NO_3) у зависности од тога шта се зна или шта се очекује у вези са појавом нитрификације (видети одељак 2.2. ове методе). Ако наступи нитрификација, али не буде потпуна, израчуна се корекција за кисеоник потрошен у нитрификацији из промена у концентрацији нитрита и нитрата (видети Део пети ове методе).

Кад се раде опциона одређивања органског угљеника, односно специфичне хемикалије, проценат разградње се израчунава на начин из одељка 1.8. ове методе.

Резултати се записују у обрасце за унос података.

5.3.2. Прихватљивост резултата

Потрошња кисеоника слепе пробе са инокулумом нормално износи 20 mg/lO_2 до 30 mg/l O_2 и не сме бити већа од 60 mg/l у 28 дана. Ако су вредности веће од 60 mg/l, критички проверити податке и испитиване технике. Ако pH вредност излази изван опсега од 6 до 8,5 и потрошња кисеоника испитиване хемикалије је мања од 60% кисеоника, испитивање се понавља са нижим концентрацијама испитиване хемикалије.

Видети одељак 1.6.2. ове методе.

5.3.3. Извештај

Видети одељак 1.9. ове методе.

5.4. ОБРАСЦИ ЗА УНОС ПОДАТАКА

Пример обрасца за унос података:

МАНОМЕТРИЈСКА РЕСПИРОМЕТРИЈА

1. ЛАБОРАТОРИЈА

2. ДАТУМ ПОЧЕТКА ИСПИТИВАЊА

3. ИСПИТИВАНА СУПСТАНЦА

Хемијски назив:

Концентрација основног раствора: ... mg/l

Почетна концентрација у подлози, Co : ... mg/l

Запремина у обичном суду (V): ... ml

ThOD или ХПК: ... mg O_2/... mg испитиване супстанце (NH_4 или NO_3)

4. ИНОКУЛУМ

Извор:

Спроведена обрада:

Прекондиционирање, ако је обављено:

Концентрација суспендованих материја у реакционој смеси: ... mg/l

5. ПОТРОШЊА КИСЕОНИКА: БИОРАЗГРАДЉИВОСТ

Време (у данима)		Време (у данима)											
		0		7		14			21			28	
Потрошња O_2 (mg) испитивана хемикалија	1												
	2												
	a, средња вредност												
Потрошња O_2 (mg) Слепа проба	3												
	4												
	b, средња вредност												
Кориговани БПК	$(a_1 - b_m)$												
	$(a_2 - b_m)$												
БПК по mg тест хемикалије	$\frac{(a_1 - b)}{C_o V}$												
	$\frac{(a_2 - b)}{C_o V}$												
% разградње $\frac{БПК}{ThOD} \times 100$	$D_1(a_1)$												
	$D_2(a_2)$												
	средња вредност (*)												
V – запремина подлоге у обичном суду													
(*) Не сме се рачунати средња вредност ако постоји велика разлика између D_1 и D_2													

Напомена:Слични обрасци могу се користити за референтну хемикалију и контролу токсичности.

6. КОРЕКЦИЈА ЗБОГ НИТРИФИКАЦИЈЕ (видети Део пети ове методе)

Дан		0	28	разлика
(I)	Концентрација нитрата (mg N/L)			(N)
(II)	Еквивалент кисеоника (4,57 × N × V) (mg)	–	–	
(III)	Концентрација нитрита (mg N/L)			(N)

(IV)	Еквивалент кисеоника (3,43 × N × V) (mg)	–	–	
(II+IV)	Укупни еквивалент кисеоника	–	–	

7. АНАЛИЗА УГЉЕНИКА (по избору)

Анализатор угљеника:

Време (у данима)	Слепа проба (mg/l)	Тест хемикалија (mg/l)
0	C_{bl0}	C_0
28 (*)	C_{blt}	C_t
(*) Или на крају инкубације		

$$\%\ \text{уклоњеног DOC} = \left(1 - \frac{C_t - C_{blt}}{C_0 - C_{bl0}}\right) \times 100$$

8. СПЕЦИФИЧНА ХЕМИКАЛИЈА (по избору)

S_b = концентрација у физичко-хемијској (стерилној) контроли 28. дана

S_a = концентрација у инокулисаном обичном суду 28. дана

$$\%\ \text{биоразградње} = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

При чему:

S_b јесте концентрација у физичко-хемијској (стерилној) контроли 28. дана;

S_a јесте концентрација у инокулисаном обичном суду 28. дана

9. АБИОТИЧКА РАЗГРАДЊА (по избору)

$$\text{потрошња } O_2 \text{ по mg испитиване хемикалије} = \frac{a \times 100}{C_s V}$$

(видети одељак 1. и 3. ове методе)

$$\%\ \text{абиотичке разградње} = \frac{a \times 100}{C_s V \times ThOD}$$

При чему *a* јесте потрошња кисеоника у стерилном обичном суду након 28 дана, (mg).

6. МЕТОДА ИСПИТИВАЊА У ЗАТВОРЕНОЈ БОЦИ (МЕТОДА C.4-E)

6.1. ПРИНЦИП МЕТОДЕ

Раствор испитиване хемикалије у минералној подлози, обично 2 mg/l до 5 mg/l, инокулише се са релативно малим бројем микроорганизама из мешане популације и чува у потпуно пуним, затвореним боцама у мраку на сталној температури. Након разградње следи анализа раствореног кисеоника у току 28 дана. Количина кисеоника коју веже испитивана хемикалија, коригиована за кисеоник који је потрошила упоредна слепа проба са инокулумом, изражава се као проценат ThOD или ХПК.

6.2. ОПИС МЕТОДЕ

6.2.1. Опрема

Опрема за испитивање садржи:

– БПК боце са стакленим затварачима, нпр. 250 ml до 300 ml;

– водено купатило или инкубатор, за чување боца на сталној температури (± 1° C или мање) без светла;

– велике стаклене боце (од 2 L до 5 L) за припрему подлоге и за пуњење БПК боца;

– кисеоничну електроду и мерни инструмент или опрему и реагенсе за Винклерову титрацију (Winkler titration).

6.2.2. Припрема минералне подлоге

За припрему основног раствора, видети одељак 1.7.2. ове методе.

Помеша се 1 (један) ml основног раствора 1 до 4 и допуни до запремине од 1 L са водом за разблаживање.

6.2.3. Припрема инокулума

Инокулум се нормално добија из секундарних отпадних вода постројења за пречишћавање или уређаја лабораторијског типа који прима углавном отпадну воду из домаћинстава. Алтернативни извор инокулума су површинске воде. Обично се користи једна капљица (од 0,05 ml до 5,0 ml филтрата по литру подлоге). Да би се пронашла оптимална запремина за одређену отпадну воду, понекад ће бити потребно више покушаја (видети одељке 1.7.4.2. и 1.7.5. ове методе).

6.2.4. Припрема обичних судова

Минерална подлога се темељно аерише у току најмање 20 минута. Свака испитивана серија поставља се са минералном подлогом добијеном из исте серије. Подлога је спремна за употребу након што одстоји 20 сати, на испитиваној температури. Одреди се концентрација растворeног кисеоника због контроле. Вредност концентрације износи око 9 mg/l на 20° C. Приликом преноса и пуњења подлоге засићене ваздухом не смеју се створити мехурићи, што се постиже помоћу сифона.

Припреме се паралелно групе БПК боца за одређивање испитиване и референтне хемикалије у упоредним серијама. Прикупи се довољан број БПК боца, укључујући слепе пробе са инокулумом, да се потрошња кисеоника може мерити најмање у дупликату у жељеним интервалима, нпр. након 0, 7, 14, 21 и 28 дана. Да би се идентификовао десетодневни период, може бити потребно више боца.

Велике боце се пуне потпуно аерисаном минералном подлогом до једне трећине запремине. Затим се сипа довољно основног раствора испитиване хемикалије и референтне хемикалије у одвојене велике боце, тако да коначна концентрација хемикалије не буде већа од 10 mg/l. У подлогу са слепом пробом као контролном у наредној великој боци не додају се никакве хемикалије.

Да би се осигурало да активност инокулума не буде ограничена, концентрација растворeног кисеоника не сме пасти испод 0,5 mg/l у БПК боцама. Ово ограничава концентрацију испитиване хемикалије на око 2 mg/l. За слабо разградљива једињења и она са ниским ThOD, може се употребити 5 mg/l до 10 mg/l. У неким случајевима, препоручљиво је поставити упоредне серије испитиване хемикалије у две различите концентрације, нпр. од 2 mg/l до 5 mg/l. ThOD се рачуна на основу награђених амонијевих соли, али ако се очекује или се зна да постоји нитрификација, израчунава се на основу створених нитрата ($ThODNO_3$: видети одељак 2.2. ове методе). Ако нитрификација није потпуна, иако постоји, ради се корекција за промене у концентрацији нитрита и нитрата, одређена анализом (видети Део пети ове методе).

Ако се одређује токсичност испитиване хемикалије (у случају, нпр. да је претходно утврђена ниска вредност биоразградљивости), потребан је још један низ боца.

Припреми се још једна велика боца и напуни аерисаном минералном подлогом (до отприлике једне трећине запремине боце) па се у боцу додају испитивана и референтна хемикалија у коначним концентрацијама које су исте као и концентрације у другим великим боцама.

Ови раствори се инокулишу у велике боце које садрже секундарни ефлуент (једна капљица или 0,05 ml/l до 5,0 ml/l) или други извор, као што је речна вода (видети одељак 1.7.4.2. ове методе). На крају се припремају раствори са аерисаном минералном подлогом помоћу гумене цеви која досеже до дна боце, да би се постигло одговарајуће мешање подлоге и раствора.

6.2.5. Број обичних судова у типичном испитивању

У типичном испитивању користи се:

– најмање 10 боца које садрже испитивану хемикалију и инокулум (испитивана суспензија);

– најмање 10 боца које садрже само инокулум (слепа проба са инокулумом);

– најмање 10 боца које садрже референтну хемикалију и инокулум (контрола поступка);

– и, по потреби, 6 боца које садрже испитивану хемикалију, референтну хемикалију и инокулум (контрола токсичности). Да би се десетодневни период могао са сигурношћу идентификовати, потребно је најмање двоструко више боца.

6.2.6. Поступак

Појединачни припремљени раствори из доње четвртине (не са дна) одговарајуће велике боце одмах се расподеле помоћу цеви у одговарајући низ БПК боца, тако да све БПК боце буду потпуно пуне. Нежним куцкањем по зиду боце уклоне се могући мехурићи ваздуха. Одмах се у нултом времену ради анализа растворeног кисеоника у БПК боцама помоћу Винклерове методе или електрода. Садржај боца може се сачувати за каснију анализу Винклеровом методом додавањем манган(II)-сулфата и натријум-хидроксида (први Винклеров реагенс). Боце се чувају добро затворене, јер је присутан кисеоник фиксиран у облику смеђег манган(III)-хидроксида, у мраку на температури од 10° C до 20° C не дуже од 24 сата пре наставка са преосталим корацима Винклерове методе. Затварачем се затворе преостали дупликати боца(пази се да у боцама не остану мехурићи ваздуха) и инкубирају се на 20° C у мраку. Уз сваку серију постоји потпуно упоредна серија за одређивање подлоге инокулиране слепом пробом. За потребе анализе узимају се најмање по две боце из исте серије због анализе растворeног кисеоника у одређеним временским интервалима (најмање једанпут недељно) у току 28 дана инкубације.

Недељни узорци треба да омогуће предвиђање процента уклањања у раздобљу од 14 дана. Узимање узорака свака 3 до 4 дана треба да омогући идентификацију раздобља од 10 дана, за што је потребно двоструко више боца.

За испитиване супстанце које садрже азот, праве се корекције за потрошњу кисеоника због могуће нитрификације. Прво се користи метода O_2-електроде да би се одредила концентрација растворeног кисеоника, а затим се извлачи узорак из

БПК боце за анализу на нитрате и нитрите. Из повећања у концентрацији нитрата и нитрита, израчуна се потрошени кисеоник (видети Део пети ове методе).

6.3. ПОДАЦИ И ИЗВЕШТАЈ

6.3.1. Обрада резултата

Прво се израчуна БПК након сваког временског интервала тако што се одузме вредност пада кисеоника (mg O_2/l) из слепе пробе са инокулумом од оне коју је показала испитивана хемикалија. Кориговани пад кисеоника подели се са концентрацијом (mg/l) испитиване хемикалије, да се добије специфични БПК као mg кисеоника по mg испитиване хемикалије. Израчуна се проценат биолошке разградљивости дељењем специфичног БПК са специфичним ThOD (израчунати у складу са одељком 2.2. ове методе) или ХПК (одређено анализом, видети одељак 2.3. ове методе), па је:

$$\text{БПК} = \frac{\text{mg потрошња} O_2 \text{ испитиванехемикалије} - \text{mg потрошња} O_2 \text{ слепе пробе}}{\text{mg испитиванехемикалијеу обичномсуду}}$$

$$= \text{mg } O_2 \text{ по mg испитиване хемикалије}$$

$$\%\ \text{разградње} = \frac{\text{БПК } (\text{mg } O_2/\text{mg испитиванехемикалије})}{\text{ThOD}(\text{mg } O_2/\text{mg испитиванехемикалије})} \times 100$$

или:

$$\%\ \text{разградње} = \frac{\text{БПК}(\text{mg } O_2/\text{mg испитиванехемикалије})}{\text{ХПК}(\text{mg } O_2/\text{mg испитиванехемикалије})} \times 100$$

Ова два поступка не дају обавезно исте вредности. Предност се даје првом поступку.

За испитиване супстанце које садрже азот, користи се одговарајући ThOD (NH_4 или NO_3) према ономе што се зна или очекује у погледу појаве нитрификације (видети одељак 2.2. ове методе). Ако је нитрификација присутна, али није потпуна, израчуна се корекција за кисеоник потрошен нитрификацијом из промена у концентрацији нитрита и нитрата (видети Део пети ове методе).

6.3.2. Прихватљивост резултата

Пад кисеоника у слепој проби са инокулумом не сме да буде виши од 1,5 mg растворeног кисеоника по литру након 28 дана. Вредности веће од ове захтевају проверу експерименталних техника. Резидуална концентрација кисеоника у испитиваним боцама не сме да се спусти на вредности ниже од 0,5 mg/l ни у једном тренутку. Тако ниски нивои кисеоника прихватљиви су само ако се поступком који се користи за одређивање растворeног кисеоника могу тачно мерити такве концентрације.

Видети одељак 1.6.2. ове методе.

6.3.3. Извештај

Видети одељак 1.9. ове методе.

6.4. ОБРАЗАЦ ЗА УНОС ПОДАТАКА

Пример обрасца за унос података:

МЕТОДА ИСПИТИВАЊА У ЗАТВОРЕНОЈ БОЦИ

1. ЛАБОРАТОРИЈА

2. ДАТУМ ПОЧЕТКА ИСПИТИВАЊА

3. ИСПИТИВАНА СУПСТАНЦА

Хемијски назив:

Концентрација основног раствора: ... mg/l

Почетна концентрација у боци: ... mg/l

ThOD или ХПК: ... mg O_2 /... mg испитиване супстанце

4. ИНОКУЛУМ

Извор:

Обављена обрада:

Прекондиционирање, ако га је било:

Концентрација у реакционој смеси: ... mg/l

5. ОДРЕЂИВАЊЕ DO

Поступак: Винклер/електрода

Анализе обичних судова

Време инкубације (у данима)			DO (mg/l)			
			0	n_1	n_2	
Слепа проба (без хемикалије)	1	C_1				
	2	C_2				
Средња вредност	$m_b = \frac{C_1 + C_2}{2}$					
Испитивана хемикалија	1	a1				
	2	a2				
Средња вредност	$m_t = \frac{a_1 + a_2}{2}$					

Напомена: Сличан образац може се користити за референтно једињење и контролу токсичности.

6. КОРЕКЦИЈА ЗБОГ НИТРИФИКАЦИЈЕ (видети Део пети ове методе)

Време инкубације (у данима)		0	n_1	n_2	n_3
(I)	Концентрација нитрата (mg N/l)				
(II)	Промена у концентрацији нитрата (mg N/l)	–			
(III)	Еквивалент кисеоника (mg/l)	–			
(IV)	Концентрација нитрита (mg N/l)				
(V)	Промена у концентрацији нитрита (mg N/l)	–			
(VI)	Еквивалент кисеоника (mg/l)	–			
(III+VI)	Укупни еквивалент кисеоника (mg/l)	–			

7. ПАД КОНЦЕНТРАЦИЈЕ РАСТВОРЕНОГ КИСЕОНИКА (DO): ПРОЦЕНАТ РАЗГРАДЊЕ

	Пад након n дана (mg/l)			
	n_1	n_2	n_3	
ОБИЧАН СУД 1: $(mt_0 - mt_x) - (mb_0 - mb_x)$				
ОБИЧАН СУД 2: $(mt_0 - mt_x) - (mb_0 - mb_x)$				
ОБИЧАН СУД 1: $\% D_1 = \frac{[(m_{t0} - m_{tx}) - (m_{b0} - m_{bx})] \times 100}{\text{конц. испит.} \times \text{ThOD хемикалије}}$				
ОБИЧАН СУД 2: $\% D_2 = \frac{[(m_{t0} - m_{tx}) - (m_{b0} - m_{bx})] \times 100}{\text{конц. испит.} \times \text{ThOD хемикалије}}$				
средња вредност $\% D^* = \frac{D_1 + D_2}{2}$				
(*) Средња вредност се не користи ако су постојале велике разлике између два мерења.				

При чему:

mt_0 јесте вредност у обичном суду у времену 0;

mt_x јесте вредност у обичном суду у времену x;

mb_0 јесте средња вредност слепе пробе у времену 0;

mb_x јесте средња вредност слепе пробе у времену x.

Примењује се корекција због нитрификације у тачки 6 (III + VI).

8. ПАД КОНЦЕНТРАЦИЈЕ РАСТВОРЕНОГ КИСЕОНИКА (DO) СЛЕПЕ ПРОБЕ

Потрошња кисеоника слепе пробе: (m_{bo} – m_{b28}) mg/l. Ова потрошња је важна за прихватљивост испитивања и нижа је од 1,5 mg/l.

7. MITI ИСПИТИВАЊЕ (МЕТОДА C.4-F)

7.1. ПРИНЦИП МЕТОДЕ

Кисеоник који потроше мешани раствор или суспензија, испитивана хемикалија у минералној подлози, инокулисана са специјално узгојеним, неприлагођеним микроорганизмима, мери се аутоматски у току 28 дана у замраченом затвореном респирометру на температури од 25° C ± 1° C. Угљен-диоксид који се развије апсорбује креч. Биоразградљивост се изражава као проценат потрошње кисеоника (коригован за потрошњу кисеоника слепе пробе) теоретске потрошње (у даљем тексту: ThOD). Проценат примарне биолошке разградљивости израчунава сеиз додатне специфичне хемијске анализе урађене на почетку и крају инкубације и опционо, DOC анализом.

7.2. ОПИС МЕТОДЕ

7.2.1. Опрема

Опрема за испитивање садржи:

– аутоматски електролитски БПК мерач или респирометар обично опремљен са 6 боца, свака запремине од 300 ml и са посудицама које садрже апсорбент за угљен-диоксид;

– сталну собну температуру, односно водено купатило температуре 25° C ± 1° C или мање;

– систем за мембранску филтрацију (није обавезан);

– уређај за анализу угљеника (није обавезан).

7.2.2. Припрема минералне подлоге

Припреме се следећи основни раствори, помоћу аналитичких реагенаса и воде (видети одељак 1.7.1. ове методе):

1. растворити у води и допунити до 1 L (pH раствора је потребно да буде 7,2):

– 8,50 g KH_2PO_4(калијум-дихидрогенфосфат);

– 21,75 gK_2HPO_4(дикалијум-хидрогенфосфат);

– 44,60 g $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ (динатријум-хидрогенфосфат додекахидрат);

– 1,70 g NH_4Cl(амонијум-хлорид);

2. растворити у води и допунити до 1 L:

– 22,50 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (магнезијум-сулфат хептахидрат);

3. растворити у води и допунити до 1 L:

– 27,50 g $CaCl_2$(калцијум-хлорид, безводни);

4. растворити у води и допунити до 1 L:

– 0,25 g $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (гвожђе(III)-хлорид хексахидрат).

Узме се 3 ml основног раствора 1, 2, 3. и 4. и допуни до 1 L.

7.2.3. Припрема инокулума

Узму се свежи узорци из најмање 10 различитих места, углавном у подручјима у којима се користе и у која се испуштају разне хемикалије. Са локација, као што су постројења за пречишћавање отпадне воде из домаћинстава, за обраду индустријске отпадних вода, река, језера, мора, прикупи се 11 узорака муља, површинског земљишта, воде, итд. и све заједно темељно се промеша. Након уклањања плутајућих материја и након слегања, супернатант се сведе на pH (7 ± 1) помоћу натријум хидроксида и фосфорне киселине.

Користи се одговарајућа запремина филтрираног супернатанта да се напуни посуда за пуњење и извлачење активног муља, а течност се аерише у току отприлике 23½ сата. Тридесет минута након аерације, баци се око једне трећине укупне запремине супернатанта и исталоженом материјалу дода једнака запремина раствора (pH 7) који садржи 0,1% глукозе, пептона и калијум ортофосфата и поново аерише. Овај поступак се понавља једанпут дневно. Јединицом за муљ управља се у складу са добром праксом: отпадна вода је бистра, температура се одржава на 25° C ± 2° C, pH је 7 ± 1, муљ се добро таложи, аерација је довољно добра тако да смеша буде стално у аеробним условима, присутне су протозое, а активност муља се испитује помоћу референтних супстанци најмање једном у три месеца. Муљ се обрађује на овакав начин најмање месец

дана пре него што се може искористити као инокулум, али не дуже од четири месеца. Након тога, узима се узорак из најмање 10 места у редовним размацима, једном свака три месеца.

Да би се одржала иста активност свежег и старог муља, филтрирани супернатант активног муља који се користи помеша се са једнаком запремином филтрираног супернатанта свеже смеше прикупљене са 10 различитих извора и тако комбинована течност одржава се у култури, како је описано. Муљ се користи као инокулум 18 до 24 сата након што је јединица напуњена.

7.2.4. Припрема обичних судова

Припреми се 6 обичних судова:

– 100 mg/l испитиване хемикалија у води за разблаживање: обичан суд бр. 1;

– 100 mg/l испитивана хемикалија у минералној подлози: обичан суд бр. 2,3 и 4;

– 100 mg/l референтне хемикалије (нпр. анилин) у минералној подлози: обичан суд бр. 5;

– само минерална подлога: обичан суд бр. 6.

Слабо растворљива испитивана хемикалија додаје се директно на бази масе или запремине или на начин како је описано у Делу трећем ове методе, осим што се не користе ни растварачи ни емулгатори. У све обичне судове дода се апсорбенс С.4-В у понуђеним специјалним посудицама. У обичним судовима бр. 2, 3 и 4 pH вредност се сведе на 7,0.

7.2.5. Извођење

Малом запремином инокулума инокулирају се обични судови бр. 2, 3 и 4 (испитивана суспензија), број 5 (контрола активности) и број 6 (слепа проба са инокулумом) да се добије концентрација од 30 mg/l суспендованих материја. Инокулум се не додаје у тиквицу број 1, која служи као абиотичка контрола. Повеже се опрема и провери да нема дотока ваздуха, покрену се мешалице и започне са мерењем потрошње кисеоника у мраку. Свакодневно се проверава температура, рад мешалице и кулометријски уређај за записивање потрошње кисеоника и записује се свака промена у боји садржаја обичних судова. Потрошња кисеоника у шест обичних судова очитава се директно одговарајућим поступком, нпр. из записа шесто-каналног читача који производи БПК криву. На крају инкубације, обично након 28 дана, мери се pH садржаја обичних судова и одређује концентрација резидуалне испитиване хемикалије и сваке концентрације која настане у међувремену, а у случају супстанци растворљивих у води, и концентрација DOC (видети одељак 2.4. ове методе). Посебну пажњу посветити непостојаним хемијским супстанцама. Ако се очекује нитрификација и ако је могуће одређује се концентрација нитрата и нитрита.

7.3. ПОДАЦИ И ИЗВЕШТАЈ

7.3.1. Обрада резултата

Потрошња кисеоника (mg) испитиване хемикалије у току одређеног времена, коригована за вредност потрошње кисеоника у контролној слепој проби са инокулумом за то исто време, подели се са масом употребљене испитиване хемикалије. Ово даје БПК изражен као mg кисеоника/mg испитиване хемикалије, односно:

$$\text{БПК} = \frac{\text{mg потрошња} O_2 \text{ испитиване хемикалије} - \text{mg потрошња} O_2 \text{ слепе пробе}}{\text{mg испитиване хемикалије у обичном суду}}$$

Проценат биоразградње се затим израчунава према формули:

$$D_t = \frac{S_b - S_s}{S_b} \times 100$$

За смеше, израчуна се ThOD из елементарне анализе, као за једноставна једињења. Користи се одговарајућа ThOD ($ThODNH_4$ или $ThODNO_3$) у зависности од тога да ли нитрификација не постоји или је непотпуна (видети одељак 2.2. ове методе). Ако нитрификација постоји, чак и само делимична, ради се корекција за кисеоник потрошен нитрификацијом који се израчуна из промена у концентрацијама нитрита и нитрата (видети Део пети ове методе).

Проценат примарне биоразградње израчунава се на основу губитка почетне хемикалије (видети одељак 1.8.2. ове методе):

$$D_t = \frac{S_b - S_s}{S_b} \times 100$$

Ако се приликом мерења физичко-хемијског уклањања изгубио део испитиване хемикалије у обичном суду број 1, то се наводи, а за израчунавање процента биоразградње користи се концентрација испитиване хемикалије (S_b) у овом обичном суду након 28 дана.

Кад се одреди DOC (опционо), проценат потпуне биоразградње рачуна се према формули:

$$D_t = \left(1 - \frac{C_t - C_{bt}}{C_s - C_{bs}}\right) \times 100$$

Као што је описано у одељку 1.8.1. ове методе ако постоји губитак DOC у обичном суду 1, мерењем физичко-хемијског уклањања, за израчунавање процента биоразградње користи се концентрација DOC у овом обичном суду.

Резултати се уписују у обрасце за унос података.

7.3.2. Прихватљивост резултата

Потрошња кисеоника у слепој проби са инокулумом обично је 20 mg/lO_2 до 30 mg/l O_2 и не сме да буде већа од 60 mg/lO_2 у 28 дана. Вредности веће од 60 mg/lO_2 захтевају критичко преиспитивање података и процедура испитивања. Ако pH вредност излази изван опсега од 6 до 8,5 и потрошња кисеоника испитиване хемикалије је мања од 60%, испитивање се понавља уз ниже концентрације испитиване хемикалије.

Видети одељак 1.7.2. ове методе.

Ако проценат разградње анинила добијен из потрошње кисеоника не прелази 40% након 7 дана и 65% након 14 дана, резултати испитивања нису прихватљиви.

7.3.3. Извештај

Видети одељак 1.9. ове методе.

7.4. ОБРАЗАЦ ЗА УНОС ПОДАТАКА

Пример обрасца за унос података:

МЕТОДА ИСПИТИВАЊА: MITI (I)

1. ЛАБОРАТОРИЈА

2. ДАТУМ ПОЧЕТКА ИСПИТИВАЊА

3. ИСПИТИВАНА СУПСТАНЦА

Хемијски назив:

Концентрација основног раствора: … mg/l као хемикалија

Почетна концентрација у подлози, C_0: ... mg/l као хемикалија

Запремина реакционе смеше,V: ... ml

ThOD: ... mg/l O_2

4. ИНОКУЛУМ

Места узимања узорака муља:

1) ..., 6) ...,

2) ..., 7) ...,

3) ..., 8) ...,

4) ..., 9) ...,

5) ..., 10) ...,

Концентрација суспендованих материја у активном муљу након аклиматизације са синтетичком отпадном водом = ... mg/l

Запремина активног муља по литру готове подлоге = ... ml

Концентрација муља у готовој подлози = ... mg/l

5. ПОТРОШЊА КИСЕОНИКА: БИОРАЗГРАДЉИВОСТ

Врста употребљеног респирометра:

			Време (у данима)				
			0	7	14	21	28
O_2 потрошња (mg) испитиване хемикалије	a_1						
	a_2						
	a_3						
O_2 потрошња (mg) слепе пробе	b						
Коригована БПК (mg)	$(a_1 - b)$ $(a_2 - b)$ $(a_3 - b)$						
БПК по mg испитиване хемикалије	$\frac{a-b}{C_0 V}$	Обичан суд 1 Обичан суд 2					
		Обичан суд 3					
% разградње $\frac{БПК}{ThOD} \times 100$		1					
		2					
		3					
		Средња вредност*					
(*) Средња вредност се не сме користити ако постоје знатне разлике између два мерења.							

Напомена: Слични обрасци могу се користити за референтну супстанцу.

6. АНАЛИЗА УГЉЕНИКА (није обавезно)

Анализатор угљеника

Обичан суд	DOC				% уклоњеног DOC	Средња вредност
	измерено		кориговано			
Вода + испитивана супстанца	a				–	–
Муљ + испитивана супстанца	b_1		b_1 -c			
Муљ + испитивана супстанца	b_2		b_2-c			
Муљ + испитивана супстанца	b_3		b_3-c			
Контрола слепом пробом	c		–		–	–

$$\% \text{ уклоњеног DOC} = \frac{a_1 - (b - c)}{a} \times 100$$

7. ПОДАЦИ СПЕЦИФИЧНЕ ХЕМИЈСКЕ АНАЛИЗЕ

	Резидуална количина испитиване супстанце на крају испитивања (mg/l)	% разградње
Испитивање слепе пробе са водом	S_b	
Инокулисана испитивана подлога	S_{a1}	
	S_{a2}	
	S_{a3}	

$$\% \text{ разградње} = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

Израчунава се проценат разградње за обичне судове a_1, a_2 и a_3.

8. НАПОМЕНЕ

Ако је могуће приложити БПК криву у функцији времена.

Део други
ИЗРАЧУНАВАЊЕ И ОДРЕЂИВАЊЕ ОДГОВАРАЈУЋИХ УКУПНИХ ПАРАМЕТАРА

У зависности од изабране методе испитивања, захтевају се одређени збирни параметри. Овај део описује поступак добијања њихових вредности. Употреба ових параметара дата је у појединим методама испитивања.

1. САДРЖАЈ УГЉЕНИКА

Садржај угљеника израчунава се из познатог састава елемената или елемената одређених анализом испитиване супстанце.

2. ТЕОРИЈСКА ПОТРОШЊА КИСЕОНИКА (ThOD)

Теоријска потрошња кисеоника (у даљем тексту: ThOD) може се израчунати ако је састав елемената познат или одређен анализом елемената. То је за једињење:

$$C_cH_hCl_clN_nNa_{na}O_oP_pS_s$$

без нитрификације,

$$ThOD_{NO_3} = \frac{16\left(2c + \frac{1}{2}(h - cl - 3n) + 3s + \frac{5}{2}p + \frac{1}{2}na - o\right)}{MW}\left[\frac{mg}{mg}\right]$$

или са нитрификацијом

$$ThOD_{NO_3} = \frac{16\left(2c + \frac{1}{2}(h - cl) + \frac{5}{2}n + 3s + \frac{5}{2}p + \frac{1}{2}na - o\right)}{MW}\left[\frac{mg}{mg}\right]$$

3. ХЕМИЈСКА ПОТРОШЊА КИСЕОНИКА (ХПК)

Хемијска потрошња кисеоника (у даљем тексту: ХПК) одређује се према Методи С.6. која је дата у овом прилогу.

4. РАСТВОРЕНИ ОРГАНСКИ УГЉЕНИК (DOC)

Растворени органски угљеник (у даљем тексту: DOC) јесте органски угљеник било које хемикалије или смеше у води који пролази кроз филтер промера 0,45 µ.

Извуку се узорци из посуда за испитивање и одмах филтрирају у филтрацијском уређају који користи одговарајући мембрански филтер. Првих 20 ml (количина се може смањити кад се користе мали филтери) филтрата се бацају. Запремине од 10 ml до 20 ml или мање, ако се инјектирају (запремина зависи од количине која је потребна за анализатор угљеника) задржавају се због анализе угљеника. Концентрација DOC одређује се помоћу анализатора органског угљеника који може тачно да измери концентрацију угљеника која је једнака или нижа од 10% почетне концентрације DOC коришћене у испитивању.

Филтрирани узорци који се не могу анализирати истог дана могу да се сачувају у фрижидеру на температури од 2° C до 4° C у току 48 сата или на температури испод - 18° C у току дужег периода.

Напомене:

Мембрански филтери су често импрегнирани површински активним материјама за хидрофилизацију. Зато филтер може садржати до неколико mg раствореног органског угљеника који утиче на одређивање биоразградљивости. Површински активне материје и друга растворљива органска једињења уклањају се из филтера кувањем филтера у дејонизованој води три пута по сат времена. Филтери се могу чувати у води недељу дана. Ако се користе једнократна пуњења филтера, свако пуњење се проверава да би се потврдило да не отпушта растворљиви органски угљеник.

Мембрански филтер, зависно од типа, може услед адсорпције задржати тест супстанцу. Пожељно је проверити да ли филтер задржава испитивану хемикалију.

Центрифугирање на 40.000 m/s^2 (4.000 g) у току 15 минута може се користити уместо филтрације за разликовање TOC од DOC. Поступак није поуздан при почетним концентрацијама мањим од 10 mg DOC/l, с обзиром на то дали су или нису уклоњене све бактерије или се угљеник као део бактеријске плазме поновно растворио.

ЛИТЕРАТУРА

1. 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.

2. Wagner, R., Von Wasser, 1976, vol. 46, 139.

3. DIN-Entwurf 38 409 Teil 41 Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung, Summarische Wirkungs- und Stoffkenngrößen (Gruppe H). Bestimmung des Chemischen Sauerstoffbedarfs (CSB) (H 41), Normenausschuß Wasserwesen (NAW) in DIN Deutsches Institut für Normung e. V.

4. Gerike, P., The biodegradability testing of poorly water soluble COmpounds. Chemosphere, 1984, vol 13 (1), 169.

Део трећи

ПРОЦЕНА БИОЛОШКЕ РАЗГРАДЉИВОСТИ СЛАБО РАСТВОРЉИВИХ СУПСТАНЦИ

У испитивању биоразградње слабо растворљивих супстанци, посебну пажњу посветити следећим аспектима:

Док су хомогене течности ретко проблем за узимање узорака, препоручује се да чврсте супстанце буду хомогенизоване одговарајућим средствима како би се избегле грешке услед нехомогености. Посебно се пази кад су потребни репрезентативни узорци од неколико милиграма из смеше хемикалија или супстанци са великом количином нечистоћа.

Током испитивања могу се користити различити облици мешања. Хемикалија се меша тек толико да остане диспергована. Прегрејавање, прекомерно стварање пене и претеране вучне силе избегавају се.

Може се користити емулгатор који омогућава стабилну дисперзију хемикалије. Емулгатор не сме да буде токсичан за бактерије и не сме да буде биоразградљив или да узрокује стварање пене у испитиваним условима.

На растваваче се примењују исти критеријуми као и на емулгаторе.

Не препоручује се коришћење чврстих носача за испитиване чврсте супстанце, али они могу бити погодни само за супстанце.

Кад се користе помоћне супстанце као што су емулгатори, растварачи и носачи, испитује се посуда са слепом пробом која садржи те помоћне супстанце.

За испитивање биоразградљивости слабо растворљивих једињења може се користити било који од три респирометријска испитивања: C.4-B, БПК, MITI.

ЛИТЕРАТУРА

1. de Morsier, A. et al., Biodegradation tests for poorly soluble COmpounds. Chemosphere, 1987, vol. 16, 833.

2. Gerike, P, The Biodegradability testing of poorly water soluble COmpounds. Chemosphere, 1984, vol. 13, 169.

Део четврти

ПРОЦЕНА БИОРАЗГРАДЉИВОСТИ ХЕМИКАЛИЈА ЗА КОЈЕ СЕ СУМЊА ДА СУ ТОКСИЧНЕ ЗА ИНОКУЛУМ

Кад се испитивана хемикалија подвргне испитивању биоразградљивости и покаже се да није брзо биоразградљива, препоручује се следећи поступак за утврђивање разлика између инибиције и инерције[1]:

За испитивања токсичности и биоразградње, користити сличне или идентичне инокулуме.

Да би се испитивањем брзе биоразградљивости проценила токсичност хемикалије, примењује се један или комбинација поступака за утврђивање инхибиције степена респирације муља (испитивање инхибиције респирације активног муља, видети у литератури[2]), БПК, односно поступака за утврђивање инхибиције раста.

Ако је потребно избећи инхибицију изазвану токсичношћу, препоручује се да концентрације испитиване супстанце која се користи у испитивању брзе биолошке разградљивости буду мање од 1/10 EC_{50} вредности (или мање од EC_{20} вредности) која се добије испитивањем токсичности. Једињења са EC_{50} вредношћу већом од 300 mg/l највероватније немају токсичне ефекте у испитивању брзе биоразградљивости.

EC_{50} вредности мање од 20 mg/l вероватно представљају озбиљне проблеме за даље тестове. Користе се ниске испитиване концентрације, због чега се користи строга и осетљива метода испитивања у затвореној боци или материјал означен изотопом угљеника C^{14}. Алтернативно, ако се ради са аклиматизованим инокулумом, користе се више концентрације испитиване супстанце. У том случају, губи се специфични критеријум методе испитивања брзе биолошке разградљивости.

ЛИТЕРАТУРА

1. Reynolds, L. et al., Evaluation of the toxicity of substances to be assessed for biodegradability. Chemosphere, 1987, vol. 16, 2259.

2. Directive 87/302/EEC.

Део пети

КОРЕКЦИЈА ПОТРОШЊЕ КИСЕОНИКА ЗБОГ УТИЦАЈА НИТРИФИКАЦИЈЕ

Грешке због пропуста да се урачуна нитрификација у процену биоразградљивости испитиване супстанце која не садржи N на основу потрошње кисеоника су маргиналне (не веће од 5%), чак и ако је појава оксидације амонијачног азота у подлози врло неправилна, као између посуда за испитивање и посуда са слепом пробом. Кад испитиване супстанце садрже N, могу се јавити озбиљне грешке.

Ако је дошло до нитрификације, али она није потпуна, опажена потрошња кисеоника реакционе смеше може се кориговати за количину кисеоника потрошеног у оксидацији амонијака на нитрите и нитрате, ако се промене у концентрацији у току инкубације нитрита и нитрата одређују помоћу једначина:

$2NH_4Cl+3O_2=2HNO_2+2HCl+2H_2O$ [1]

$2HNO_2+O_2=2HNO_3$ [2]

Укупно:

$2NH_4Cl+4O_2=2HNO_2+2HCl+2H_2O$ [3]

Из једначине [1] види се да 28 g азота из амонијум хлорида (NH_4Cl) потроши 96 g кисеоника у току оксидације до нитрита, односно фактор је 3,43 (96/28). На исти начин, из једначине [3] види се да 28 g азота потроши 128 g кисеоника у току оксидације до нитрата, односно фактор је 4,57 (128/28).

С обзиром да су реакције секвенцијалне, а за њих су заслужне различите бактеријске врсте, концентрација нитрита се може повећати или смањити. Дакле:

O_2 потрошен у стварању нитрата = 4,57 x повећање концентрације нитрата [4]

и

O_2 потрошен у стварању нитрата = 3,43 x повећање концентрације нитрата [5]

и

губитак O_2 због губљења нитрата = –3,43 x смањење концентрације нитрата [6]

тако да је:

O_2 потрошња због нитрификације = ±3,43 x промена конц. нитрита + 4,57 x повећање концентарције нитрита [7]

и стога је:

O_2 потрошња због С оксидације = укупна опажена потрошња због нитрификације. [8]

Алтернативно, ако се одређује само укупни оксидовани N, може се прихватити да је потрошња кисеоника због нитрификације, као прва апроксимација, 4,57 пута повећање у оксидованом N.

Коригована вредност за потрошњу кисеоника због С оксидације се онда пореди са $ThODNH_3$, као што је израчунато у Делу другом ове методе.

С.5. РАЗГРАДЊА – БИОХЕМИЈСКА ПОТРОШЊА КИСЕОНИКА

1. МЕТОДА ИСПИТИВАЊА

1.1. УВОД

Циљ ове методе је мерење биохемијске потрошње кисеоника (у даљем тексту: БПК) за чврсте и течне органске супстанце.

Подаци добијени у овом испитивању односе се на једињења растворљива у води. Могу се испитивати и једињења која су испарљива, као и једињења која су слабо растворљива у води.

Метода се може применити само за оне органске супстанце које не делују инхибиторно на бактерије у концентрацијама које се користе у испитивању. Ако испитивана супстанца није растворљива у изабраним концентрацијама, додатне мере (као што је ултразвучна дисперзија) могу се користити како би се постигла добра дисперзија испитиване супстанце.

Подаци о токсичности испитиване супстанце могу да буду корисни при тумачењу резултата испитивања где су добијене мале вредности за БПК, а помажу и у избору одговарајућих концентрација за испитивање дате супстанце.

1.2. ДЕФИНИЦИЈЕ И МЕРНЕ ЈЕДИНИЦЕ

Биохемијска потрошња кисеоника (БПК) јесте маса растореног кисеоника потребна за процес биохемијске оксидације у специфичној запремини раствора испитиване супстанце под условима дефинисаним за ово испитивање.

Резултати се изражавају у грамима као g БПК/g испитиване супстанце.

1.3. РЕФЕРЕНТНЕ СУПСТАНЦЕ

Пожељно је користити адекватне референтне супстанце да би се проверила активност инокулума.

1.4. ПРИНЦИП МЕТОДЕ

Унапред одређена количина испитиване супстанце, која је растворена или диспергована у добро аерисаном медијуму, инокулира се са микроорганизмима и инкубира на тачно одређеној константној температури у одсуству светлости.

БПК се одређује као разлика садржаја растореног кисеоника на почетку и на крају испитивања. Испитивање траје најмање пет дана, али не дуже од 28 дана.

Као слепу пробу користити резултате напоредног испитивања без присуства испитиване супстанце.

1.5. КРИТЕРИЈУМИ КВАЛИТЕТА

Одређивање БПК не може да се сматра валидном мером биоразградљивости испитиване супстанце. Ово испитивање се може посматрати само као скрининг тест.

1.6. ОПИС МЕТОДЕ

Прелиминарни раствор или дисперзија припремају се тако да се постигне одговарајућа концентрација БПК компатибилна са методом која се користи. БПК се затим одређује применом било које одговарајуће стандардизоване методе.

2. ПОДАЦИ И ПРОЦЕНА

БПК за прелиминарни раствор испитиване супстанце израчунава се према изабраној стандардизованој методи и изражава се у грамима БПК по граму испитиване супстанце.

3. ИЗВЕШТАЈ

У извештају о испитивању наводи се која метода је коришћена у испитивању.

Вредност БПК представља средњу вредност за најмање три валидна мерења.

Наводе се и сви подаци и напомене релевантне за тумачење резултата, а посебно подаци који су у вези са нечистоћама, физичким карактеристима, токсичним ефектом и саставом испитиване супстанце.

У извештају се наводи и употреба адитива који се користе ради спречавања биолошке нитрификације.

4. ЛИТЕРАТУРА

Листа стандардизованих метода:

1. NF T 90-103: Determination of the biochemical oxygen demand.

2. NBN 407: Biochemical oxygen demand.

3. NEN 32355.4: Bepaling van het biochemish zuurstofverbruik (BZV).

4. The determination of biochemical oxygen demand, Methods for the examination of water and associated materials, HMSO, London.

5. ISO 5815: Determination of biochemical oxygen demand after n days.

C.6. РАЗГРАДЊА – ХЕМИЈСКА ПОТРОШЊА КИСЕОНИКА

1. МЕТОДА ИСПИТИВАЊА

1.1. УВОД

Циљ ове методе је мерење хемијске потрошње кисеоника (у даљем тексту: ХПК) за чврсте и течне органске супстанце, у тачно дефинисаним лабораторијским условима.

Познавање хемијске формуле супстанце корисно је за извођење методе испитивања као и за тумачење добијених резултата (нпр. соли халогених елемената, органске соли гвожђа, органохлорна једињења).

1.2. ДЕФИНИЦИЈЕ И МЕРНЕ ЈЕДИНИЦЕ

Хемијска потрошња кисеоника (ХПК) јесте мера способности неке супстанце да буде оксидована, а изражава се као еквивалентна количина кисеоника оксидујућег средства која је потребна за оксидацију супстанце у тачно дефинисаним лабораторијским условима.

Резултат се изражава у грамима, као g ХПК/g испитиване супстанце.

1.3. РЕФЕРЕНТНЕ СУПСТАНЦЕ

Референтне супстанце се не користе у свим случајевима приликом тестирања нових супстанци. Референтне супстанце служе првенствено за периодичну калибрацију методе и омогућавају поређење резултата уколико се примењује нека друга метода.

1.4. ПРИНЦИП МЕТОДЕ

Унапред одређена количина испитиване супстанце која је растворена или диспергована у води, се оксидује са калијум дихроматом у медијуму закисељеном са сумпорном киселином и са сребро-сулфатом као катализатором, под рефлуксом у току 2 сата. Преостали дихромат се одређује титрацијом помоћу стандардизованог гвожђе-амонијум сулфата.

У случају да испитиване супстанце садрже хлор, додати живу-сулфат[III] да би се смањила интерференција хлорида.

_____

III Након употребе, раствори које садрже живине соли третирају се да би се избегло испуштање живе у животну средину.

1.5. КРИТЕРИЈУМИ КВАЛИТЕТА

Због арбитрарног начина одређивања, ХПК је „индикатор способности оксидовања”, па се ова метода користи као практичан поступак за одређивање садржаја органске материје.

Хлориди могу да утичу на ово испитивање. Неорганска редукујућа или оксидујућа средства такође могу да утичу на одређивање ХПК.

Нека циклична једињења и многе испарљиве супстанце (нпр. ниже масне киселине) не могу се потпуно оксидовати применом поступка описаног у овој методи.

1.6. ОПИС МЕТОДЕ

Припреми се прелиминарни раствор или дисперзија испитиване супстанце да се добије ХПК између 250 mg/l и 600 mg/l.

Напомене:

У случају да се ради о слабо растворљивим супстанцама или супстанцама које се не могу дисперговати, може се одмерити количина прашкасте супстанце или супстанце у течном облику која одговара количини од 5 mg ХПК и ставити у посуду са водом.

ХПК се често, и нарочито у случају слабо растворљивих супстанци, погодно одређује модификацијом поступка, односно у затвореном систему са изједначавањем притиска[1]. Применом ове модификоване методе, супстанце за које нису прикладне конвенционалне методе, као нпр. сирћетна киселина, могу се успешно квантификовати. У случају пиридина ова метода није примењива.

Уколико се концентрација калијум дихромата, као што је препоручено у литератури[1], повећа на 0,25 N (0,0416 M), олакшано је директно мерење 5 mg до 10 mg супстанце, што је неопходно за одређивање ХПК за слабо растворљиве супстанце[2].

У осталим случајевима, ХПК се одређује применом било које одговарајуће домаће или међународне стандардизоване методе испитивања.

2. ПОДАЦИ И ПРОЦЕНА

ХПК у посуди израчунава се према изабраном нормализованом поступку и претвара се у граме ХПК по граму испитиване супстанце.

3. ИЗВЕШТАЈ

У извештају о испитивању наводи се која метода је коришћена при испитивању.

ХПК представља средњу вредност најмање три мерења. Наводе се сви подаци и напомене меродавне за тумачење резултата, нарочито оне које се односе на присуство нечистоћа и својства испитиване супстанце (ако су позната), која би могла утицати на резултате.

Наводи се и да ли је коришћен живин сулфат у циљу смањења утицаја хлорида.

4. ЛИТЕРАТУРА

1. NBN T 91-201 Determination of the chemical oxygen demand.

2. ISBN O 11 7512494 Chemical oxygen demand (dichromate value) of polluted and waste waters.

3. NF T 90-101 Determination of the chemical oxygen demand.

4. DS 217 = water analysis Determination of the chemical oxygen demand.

5. DIN 38409-H-41 Determination of the chemical oxygen demand (COD) within the range above 15 mg per litre.

6. NEN 3235 5.3 Bepaling van het chemisch zuurstofverbruik.

7. ISO 6060 Water quality: chemical oxygen demand dichromate methods.

C.7. РАЗГРАДЊА – АБИОТИЧКА РАЗГРАДЊА: ХИДРОЛИЗА КАО ФУНКЦИЈА pH

Део први

1. МЕТОДА ИСПИТИВАЊА

Метода се заснива на Упутству за испитивање OECD 111 (2004).

1.1. УВОД

Хемикалије могу доспети у површинске воде директним уношењем, распршивањем, изливањем, дренажом или као последица одлагања отпада из индустрије, домаћинстава и пољопривреде, из отпадних вода или атмосфере. Доспеле хемикалије у површинским водама могу бити трансформисане хемијски (нпр. хидролиза, оксидација), фотохемијски, односно микробиолошки. Ова метода описује лабораторијску методу испитивања за процену абиотичке хидролитичке трансформације

хемикалија у воденим системима при вредностима pH које су уобичајено карактеристичне (pH 4-9) и базира се на упутствима[1, 2, 3, 4, 5, 6, 7].

Експерименти се изводе у циљу одређивања:

1) степена хидролизе испитиване супстанце у функцији pH и

2) природе/начина и степена образовања и смањења продуката хидролизе којима организми могу бити изложени.

Ови експерименти могу да буду обавезни за хемикалије које се директно примењују на површинске воде или за хемикалије за које постоји велики степен вероватноће да ће доспети у животну средину неким од путева уноса наведеним у овом одељку.

1.2. ДЕФИНИЦИЈЕ И МЕРНЕ ЈЕДИНИЦЕ

У свим испитивањима користе се мерне јединице које су обухваћене Међународним системом јединица (SI).

Испитивана супстанца јесте било која супстанца, односно полазна супстанца или одговарајући продукт хидролизе.

Продукти трансформације јесу све супстанце које настају као продукт у реакцијама биотичке или абиотичке трансформације.

Продукти хидролизе јесу све супстанце које настају као продукти хидролитичке трансформације испитиване супстанце.

Хидролиза јесте реакција испитиване супстанце (у даљем тексту: RH) са водом, са заменом H групе са OH групом:

$RH + HOH \rightarrow ROH + HH$ [1]

Стопа којом се концентрација RH смањује у поједностављеном поступку представља се формулама:

стопа = $k[H_2O][RH]$, за реакције другог реда или

стопа = $k[RH]$, за реакције првог реда,

у зависности од корака којим се одређује стопа.

С обзиром на то да је вода присутна у знатно већој количини у односу на испитивану супстанцу, овај тип реакције се уобичајено описује као реакција псеудо-првог реда у којој је забележена константа дата односом:

$k_{obs} = k[H_2O]$ [2]

и може бити одређена изразом[iv]:

$$k_{obs} = \frac{1}{t}\ln\frac{C_0}{C_t} \quad [3]$$

при чему:

t јесте време;

C_0, C_t јесу концентрације RH у времену 0 и t.

Јединица мере ове константе јесте $(\text{време})^{-1}$.

Полувреме реакције јесте време потребно за реакцију 50% RH које се одређује формулом:

$$t_{0,5} = \frac{\ln 2}{k_{obs}} \quad [4]$$

Време полуживота ($t_{0,5}$) јесте време потребно за 50% хидролизу испитиване супстанце када се хидролиза може описати кинетиком првог реда. Ова вредност је независна од концентрације.

Време нестајања 50 (у даљем тексту: DT_{50}) јесте временски период у оквиру којег се концентрација испитиване супстанце смањи за 50%. Разликује се од параметра $t_{0,5}$ када се хидролиза не може описати као кинетика првог реда.

Процена k на различитим температурама

Када су познате константе степена хидролизе за две температуре, константе степена за друге температуре могу се израчунати Архениусовом једначином:

$$k = A \times e^{-\frac{E}{R \times T}}$$

или

$$\ln k = \ln A - \frac{E}{R \times T}$$

Графички приказ односа lnk према 1/T даје праву са нагибом – E/R, при чему:

K јесте константа степена хидролизе, мерена на различитим температурама;

E јесте енергија активације (kJ/mol);

T јесте апсолутна температура (T);

R јесте гасна константа (8.314 J/mol.K).

Енергија активације израчунава се регресионом анализом једначином:

$$E = R \times \frac{\ln k_2 - \ln k_1}{\left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2}\right)}$$

при чему је $T_2 > T_1$.

_____

IV Уколико се на графичком приказу лог-трансформисаних података у функцији времена не уочава линеарна повезаност (у складу са константом првог реда), употреба једначине [3] није адекватна за одређивање константе степена хидролизе испитиване супстанце.

1.3. ПРИМЕНА МЕТОДЕ

Метода се примењује за хемијске супстанце (обележене или необележене) за које постоји довољно прецизна и осетљива аналитичка метода. Метода може да се примени и за супстанце које нису или су у мањој мери испарљиве уколико су растворљиве у води. Методу не примењивати за хемикалије које су у воденим растворима лако испарљиве (нпр. фумиганти, органски растварачи) и које не могу да образују стабилне растворе у испитиваним условима прописаним за ову методу. Ова метода није прикладна за супстанце слабо растворљиве у води.

1.4. ПРИНЦИП МЕТОДЕ

Стерилни водени раствори пуфера различитих pH вредности (pH 4, 7 и 9) у којима је растворена испитивана супстанца инкубирају се у мраку у контролисаним лабораторијским условима (на константној температури). Након одговарајућег времена, пуферски раствори се анализирају на испитивану супстанцу и на продукте хидролизе. Уколико се испитују обележене супстанце (нпр. C^{14}), може се лакше успоставити масени биланс.

Ова метода испитивања изводи се као етапни приступ који је дат у Делу другом ове методе. Избор наредне етапе испитивања одређен је резултатима претходне етапе.

1.5. ПОДАЦИ О ИСПИТИВАНОЈ СУПСТАНЦИ

Необележене или обележене супстанце могу се користити за мерење степена хидролизе. Предност за проучавање путева хидролизе и за успостављање масеног баланса даје се обележеним супстанцама. У специјалним случајевима обележавање супстанци није неопходно. Препоручује се обележавање супстанци са C^{14}, али се могу употребљавати и други изотопи као што су C^{13}, N^{15}, H^{3}. Колико је год могуће, потребно је обележити најстабилнији део молекула. На пример, уколико испитивана супстанца садржи један прстен, обележавање овог прстена је обавезно; уколико супстанца садржи два или више прстена, потребно је извести додатне експерименте да би се проценила судбина сваког појединачног прстена који је обележен да би се добили подаци о образовању продуката хидролизе. Проценат чистоће супстанце да буде најмање 95%.

Пре извођења испитивања, потребно је о испитиваној супстанцимати податке:

– растворљивост у води (видети Методу А.6. која је дата у овом правилнику);

– растворљивост у органским растварачима;

– напон паре (видети Методу А.4. која је дата у овом правилнику) и Хенријева константа;

– подеони коефицијент *n*-октанол/вода (видети Методу А.8. која је дата у овом правилнику);

– константна дисоцијације pK_a (видети у литератури[9]);

– степен директне и индиректне фототрансформације у води, уколико је потребно.

Треба да буду познати и подаци о аналитичким методама за квантификацију испитиване супстанце и уколико је релевантно, подаци о методама за идентификацију и квантификацију продуката хидролизе у воденим растворима (видети одељак 1.7.2. ове методе).

1.6. РЕФЕРЕНТНЕ СУПСТАНЦЕ

Референтне супстанце, када је могуће, користе се за идентификацију и кванитификацију продуката хидролизе применом спектроскопских и хроматографксих метода или неке друге довољно осетљиве методе.

1.7. КРИТЕРИЈУМИ КВАЛИТЕТА

1.7.1. Ефикасност примењене аналитичке методе

Анализа пуферских раствора или њихових екстраката непосредно након додавања испитиване супстанце у најмање два понављања даје прве индиције о ефикасности аналитичке методе и уједначености примене изабраног поступка за испитивану супстанцу. Ефикасност за даље фазе експеримента одређује се на основу разлике масе (када се користи обележени материјал). Проценат ефискасности износи од 90% до 110% за обележене и необележене хемикалије[7]. У случају да постоје техничке потешкоће да се задовољи овај критеријум, ефикасност од 70% је прихватљива за необележене хемикалије, уз додатно објашњење.

1.7.2. Поновљивост и осетљивост аналитичке методе

Поновљивост аналитичке методе којом се квантификује испитивана супстанца и касније продукти хидролизе може се проверити анализом пуферског раствора (или њихових екстраката) у два понављања након што се образују продукти хидролизе у довољним количинама за квантификацију.

Аналитичка метода треба да је довољно осетљива за квантификацију до највише 10% од почетне концентрације супстанце. Уколико је релевантно, аналитичка метода треба да буде довољно осетљива и за квантификацију било којих продуката хидролизе који представљају 10% или више (у било ком времену у периоду испитивања) од примењене концентрације, до 25% или мање од највише концентрације.

1.7.3. Интервали поверења за кинетичке податке о хидролизи

Интервали поверења се израчунавају за све коефицијенте регресионе праве, константе, време полуживота и било које друге кинетичке параметре (нпр. DT_{50}).

1.8. ОПИС МЕТОДЕ

1.8.1. Опрема и инструменти

Експерименти се изводе у стакленим посудама (нпр. епруветама, тиквицама) у мраку и у стерилним условима, уколико је неопходно, осим уколико прелиминарни подаци (као што је подеони коефицијент *n*-октанол/вода) указују на то да супстанца пријања за стаклене површине. У тим случајевима, може се разматрати употреба других материјала (као што је тефлон). Проблем пријањања (адхезије) на стакло може се решити и:

– одређивањем масе испитиване супстанце и продуката хидролизе који су сорбовани на зидове посуде;

– употребом ултразвучних купатила;

– спирањем са зидова посуде са растварачем при сваком узимању узорака за анализу;

– коришћењем формулисаних производа;

– употребом додатних растварача за увођење испитиване супстанце у систем, додатни растварач не сме да утиче на хидролизу супстанце.

Водена купатила са мешалицом или инкубатори са терморегулацијом потребни су за инкубацију раствора различитих концентрација испитиване супстанце.

Потребна је стандардна лабораторијска опрема која садржи:

– pH-метар;

– инструменте за аналитичка мерења као што су GC, HPLC, TLC укључујући и одговарајуће системе за детекцију супстанци обележених или необележених радиоизотопима или метода инверзног разблажења изотопа;

– инструменте за идентификацију (нпр. MS, GC-MS, HPLC-MS, NMR, итд.);

– течни сцинтилаторски бројач;

– сепарационе левкове за течно-течну екстракцију;

– опрему за концентровање раствора и екстраката (нпр. ротирајући евапоратор);

– опрему за одржавање температуре (нпр. водено купатило).

Хемијски реагенси укључују:

– органске растваре, аналитичке чистоће, као што је хексан, дихлорометан, итд;

– течност за сцинтилаторски бројач;

– пуферски раствори (видети одељак 1.8.3. ове методе).

Све стаклене посуде, редестилована вода и пуферски раствори који се користе стерилни су.

1.8.2. Увођење испитиване супстанце

Испитивана супстанца се уводи у пуферски систем у облику воденог раствора (видети Део четврти ове методе). Употреба малих количина раствора који се добро мешају са водом (као што је ацетонитрил, ацетон, етанол) дозвољена је за увођење и дистрибуцију испитиване супстанце, али количина не треба да буде већа од 1% v/v. У случају да се разматра

употреба веће количине растварача (нпр. код слабо растворљивих супстанци), ово се може дозволити само ако се докаже да растварач нема утицај на хидролизу испитиване супстанце.

За рутинску употребу не препоручују сеформулисани производи, јер се не може искључити могућност да састојци формулације утичу на процес хидролизе. За слабо растворљиве супстанце или за супстанце које пријањају на стаклене површине (видети одељак 1.8.1. ове методе) употреба формулисаних производа може да буде одговарајућа алтернатива.

Испитује се само једна концентрација испитиване супстанце. Концентрација не сме да прелази 0,01M или половину концентрације засићеног раствора.

1.8.3. Пуферски раствори

Ова метода испитивања изводи се при вредностима pH од 4, 7 и 9. За потребе овог испитивања, пуферски раствори се припремају са хемикалијама аналитичке чистоће и редестилованом водом. Неки од пуферских система који се користе дати су у Делу трећем ове методе. Пуферски систем може да утиче на хидролизу и уколико се уоче промене користи се други пуферски систем.

Вредности pH сваког пуферског раствора проверавати са калибрисаним pH-метром са прецизношћу најмање 0,1 у дефинисаним температурним условима.

1.8.4. Услови испитивања

1.8.4.1. Температура

Испитивања хидролизе изводити на константној температури. Ради екстраполације резултата, неопходно је одржавати температуру са минималним варирањем ± 0,5° C.

Прелиминарно испитивање (Етапа 1) изводи се на температури од 50° C уколико се не располаже подацима о начину хидролизе супстанце. Наредне етапе кинетичких испитивања изводе се на најмање три различите температуре (укључујући и испитивање на температури од 50° C) осим ако је прелиминарним испитивањем (Етапа 1) доказано да супстанца не подлеже хидролизи. Препоручени температурни опсег је 10° C до 70° C (пожељно је да се најмање једно испитивање изведе на температури мањој од 25° C) који обухвата не само температуру од 25° C за коју се подноси извештај о испитивању, већ и већину вредности температура забележених у природним условима.

1.8.4.2. Осветљење и кисеоник

За испитивање хидролизе потребно је изабрати одговарајућу методу за минимизирање фотолитичких ефеката. Предузимају се одговарајуће мере за спречавање оксидације (нпр. удувавањем хелијума, азота или аргона 5 минута пре припреме раствора).

1.8.4.3. Трајање испитивања

Прелиминарно испитивање (Етапа 1) траје 5 дана. Наредне етапе испитивања трају све док се 90% испитиване супстанце не хидролизује или 30 дана, зависно од тога који услов се пре испуни.

1.8.5. Извођење испитивања

1.8.5.1. Прелиминарно испитивање (Етапа 1)

Прелиминарно испитивање се изводи на температури од 50° C ± 0,5° C при вредностима pH од 4, 7 и 9. Уколико испитивана супстанца хидролизује мање од 10% у току периода од 5 дана, ($t_{0,5\ 25°C}$ > 1 године) за ту супстанцу се сматра да не подлеже хидролизи и није потребно даље испитивање. Ако је за супстанцу доказано да подлеже хидролизи на амбијенталној температури[V] није неопходно прелиминарно испитивање. Аналитичка метода је потребно да буде довољно прецизна и осетљива да се може детектовати 10% редукције почетне концентрације испитиване супстанце.

_____

V Ови подаци могу да потичу од других извора као што су: подаци о хидролизи структурно сличних једињења из литературе или других прелиминарних, семи-квантитативних испитивања хидролизе са испитиваном супстанцом у фазама развијања методе.

1.8.5.2. Хидролиза нестабилних супстанци (Етапа 2)

Следећа етапа испитивања изводи се при pH вредностима при којима је дата испитивана супстанца нестабилна, а што је доказано прелиминарним испитивањем. Пуферски раствори испитиване супстанце темперирају се на изабраној температури. За испитивање кинетике првог реда, сваки раствор испитиване супстанце анализира се у одређеним временским интервалима што омогућава добијање најмање шест правилно распоређених вредности у опсегу од 10% до 90% хидролизе испитиване супстанце. По један узорак супстанце узима се за мерење у шест временских интервала (уколико је испитивање постављено у најмање два понављања у одвојеним посудама) и изузима из испитивања (добија се сет података од најмање дванаест вредности). Није адекватно постављање испитивања само са јединственим узорком из кога ће се узимати појединачне аликвоте за мерења у временским интервалима, јер не омогућава анализу варијабилности података и може да доведе до контаминације раствора испитиване супстанце. Испитивања којима се утврђује да су експериментални услови стерилни изводе се на крају завршних етапа, односно након хидролизе 90% испитиване супстанце или након 30 дана. Ако се не уочава разградња (трансформација) супстанце, није неопходно изводити ова испитивања.

1.8.5.3. Идентификација продуката хидролизе (Етапа 3)

Све важније продукте хидролизе, односно оне продукте који представљају најмање 10% примењене дозе испитиване супстанце идентификовати одговарајућим аналитичким методама.

1.8.5.4. Додатна испитивања

За испитивање супстанци који не подлежу хидролизи могу бити неопходна додатна испитивања која се изводе при различитим вредностима pH од 4, 7 и 9.

На пример, код проучавања физиолошких процеса може бити потребно изводити испитивање у киселој средини (нпр. pH 1,2) при температурним условима који су физиолошки релевантни (37° C).

2. ПОДАЦИ

Количина испитиване супстанце и продуката хидролизе изражава се у процентима у односу на примењену почетну концентрацију испитиване супстанце, и када је прикладно, у mg/l за сваки временски интервал мерења и при свим pH вредностима и температурама. Када се у испитивању користе обележене супстанце масени баланс се изражава у процентима у односу на примењену почетну концентрацију.

Резултати испитивања представљају се графички: лог-трансформисани подаци за концентрацију испитиване супстанце у функцији времена. Треба идентификовати све важније продукте хидролизе, односно продукте који представљају најмање 10% примењене дозе испитиване супстанце. Податке за концентрацију продуката хидролизе трансформисати у лог-трансформисане податке (идентично као и за испитивану супстанцу) да би се уочио степен образовања и смањења продуката хидролизе.

2.1. ОБРАДА ПОДАТАКА

Прецизније израчунавање вредности полуживота или вредности DT_{50} постиже се применом одговарајућих кинетичких модела. Вредности полуживота, односно вредности DT_{50} (укључујући и интервале поверења) приказују се за сваку pH вредност и температуру са описом коришћеног модела, степеном кинетике и коефицијента корелације (r^2). Ове рачунице могу се применити за продукте хидролизе.

Када се испитивања изводе на различитим температурама, константе хидролизе псеудо-првог реда ($к_{обс}$) описати у функцији температуре. Израчунавања се заснивају на рашчлањивању вредности $к_{обс}$ на вредности константе за хидролизу у киселој, неутралној и базној средини ($к_H$, $к_{неутрал}$ и $к_{OH}$) и Архениусовој једначини:

$$k_{obs} = k_H[H^+] + k_{neutral} + k_{OH}[OH^-] = \sum_{i=H,neutral,OH} A_i e^{-B_i/T}$$

при чему:

A_i и B_i јесу вредности константе за одсечак и константе за нагиб регресионе праве добијене регресионом анализом вредности ln k_i у функцији реципрочних вредности за апсолутну температуру изражених у Келвинима (T).

Преко Архениусове једначине која изражава везу између константи за хидролизу у киселој, неутралној и базној средини, могу се израчунати вредности константе кинетике псеудо-првог реда, а самим тим и вредности полуживота за различите температуре за које није могуће директно експериментално одређивање константи.

2.2. ПРОЦЕНА И ТУМАЧЕЊЕ РЕЗУЛТАТА

Већина реакција хидролизе одиграва се по кинетици првог реда, те је време полуживота независно од концентрације (видети једначину 4 у Делу другом ове методе). Ово дозвољава екстраполацију резултата добијених у лабораторијским експериментима одређених за концентрације од 10^{-2}M до 10^{-3} M на услове у животној средини (≤ 10^{-6}).

Примере добре корелације између степена хидролизе измерених у испитивањима у чистој и у амбијенталној води за сет хемикалије, уз услов да се мере pH вредност и температура, дали су Мабеј и Мил[1].

3. ИЗВЕШТАЈ

Извештај о испитивању садржи податке о:

1. испитиваној супстанци:

– уобичајени назив, хемијски назив, CAS број, структурна формула (са назначеном позицијом молекула који је обележен радиоизотопом) и релевантна физичка и хемијска својства (видети одељак 1.5. ове методе);

– степен чистоће супстанце;

– степен чистоће ознаке и означене супстанце, као и моларна активност (где је прикладно);

– пуферски раствори;

– време и начин припреме;

– пуферски раствори и вода који се користе у испитивању;

– моларна концентрација и pH вредности пуферских раствора;

2. условима испитивања:

– датум извођења испитивања;

– количина испитиване супстанце;

– начин увођења испитиване супстанце у раствор пуфера и врста растварача (као и количина);

– запремина пуферских раствора који се инкубирају (пуфески раствор у који је растворена испитивана супстанца);

– опис система за инкубацију;

– pH вредност и температура;

– време узимања узорака за анализу;

– начин екстракције;

– методе за квантификацију и идентификацију испитиване супстанце и продуката хидролизе у пуферским растворима;

– број понављања;

3. Резултатима:

– поновљивост и осетљивост примењених аналитичких метода;

– ефикасност (критеријуми за валидност испитивања дати су у одељку 1.7.1. ове методе);

– подаци за појединачна понављања и њихове средње вредности изражени у табелама;

– масени баланс у току и на крају испитивања (кад се користе обележене супстанце);

– резултати прелиминарног испитивања;

– тумачење резултата;

– сви оригинални (сирови) подаци и графици.

Када је одређен степен хидролизе у извештају о испитивању наводе се:

– графички приказ концентрација испитиване супстанце у функцији времена, када је могуће и за продукте хидролизе за сваку pH вредност и температуру;

– резултати Архенијусове једначине за температуру 20° C/25° C са pH вредностима, константе (x-1 или дан-1), време полуживота или DT_{50}, температуре (°C) укључујући и интервале поверења и коефицијенте корелације (p_2);

– предложени пут хидролизе.

4. ЛИТЕРАТУРА

1. OECD, (1981) Hydrolysis as a Function of pH. OECD Guideline for Testing of Chemicals No 111, adopted 12 May 1981.

2. US-Environmental Protection Agency, (1982) 40 CFR 796.3500, Hydrolysis as a Function of pH at 25 oC. Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental Fate.

3. Agriculture Canada, (1987) Environmental Chemistry and Fate Guidelines for registration of pesticides in Canada.

4. European Union (EU), (1995) COmmission Directive 95/36/EC amending COuncil Directive 91/414/EEC COncerning the placing of plant protection products on the market. Annex V: Fate and Behaviour in the Environment.

5. Dutch COmmission for Registration of Pesticides, (1991) Application for registration of a pesticide. Section G: Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.

6. BBA, (1980) Merkblatt No 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 No 23.

9. OECD, (1993) Guidelines for the Testing of Chemicals. Paris. OECD (1994-2000): Addenda 6-11 to Guidelines for the Testing of Chemicals.

10. Nelson, H, Laskowski D, Thermes S, and Hendley P., (1997) ReCOmmended changes in pesticide fate study guidelines for improving input to COmputer models. (Text version of oral presentation at the 14th Annual Meeting of the Society of Environmental ToxiCOlogy and Chemistry, Dallas TX, November 1993).

11. Mabey, W. and Mill, T., (1978) Critical review of hydrolysis of organic COmpounds in water under environmental COnditions. J. Phys. Chem. Ref. Data 7, p. 383-415.

Део други

ШЕМА ЕТАПНОГ ИСПИТИВАЊА ХИДРОЛИЗЕ

Део трећи
ПУФЕРСКИ СИСТЕМИ

Пуферске смеше према Кларку и Лубсу:

Састав	pH[VI]
0,2 N HCl анд 0,2 N KCl на 20°C	
47,5 ml HCl + 25 ml KCl, растворити од 100 ml	1,0
32,25 ml HCl + 25 ml KCl, растворити до 100 ml	1,2
20,75 ml HCl + 25 ml KCl, растворити до 100 ml	1,4
13,15 ml HCl + 25 ml KCl, растворити до 100 ml	1,6
8,3 ml HCl + 25 ml KCl, растворити до 100 ml	1,8
5,3 ml HCl + 25 ml KCl, растворити до 100 ml	2,0
3,35 ml HCl + 25 ml KCl, растворити до 100 ml	2,2

0,1 M калијум бифталат + 0,1 N HCl на 20° C	
46,70 ml 0,1 N HCl + 50 ml бифталата, допунити до 100 ml	2,2
39,60 ml 0,1 N HCl + 50 ml бифталата, допунити до 100 ml	2,4
32,95 ml 0,1 N HCl + 50 ml бифталата, допунити до 100 ml	2,6
26,42 ml 0,1 N HCl + 50 ml бифталата, допунити до 100 ml	2,8
20,32 ml 0,1 N HCl + 50 ml бифталата, допунити до 100 ml	3,0
14,70 ml 0,1 N HCl + 50 ml бифталата, допунити до 100 ml	3,2
9,90 ml 0,1 N HCl + 50 ml бифталата, допунити до 100 ml	3,4
5,97 ml 0,1 N HCl + 50 ml бифталата, допунити до 100 ml	3,6
2,63 ml 0,1 N HCl + 50 ml бифталата, допунити до 100 ml	3,8
0,1 M калијум бифталат + 0,1 N NaOH на 20° C	
0,40 ml 0,1 N NaOH + 50 ml бифталата, допунити до 100 ml	4,0
3,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml бифталата, допунити до 100 ml	4,2
7,50 ml 0,1 N NaOH + 50 ml бифталата, допунити до 100 ml	4,4
12,15 ml 0,1 N NaOH + 50 ml бифталата, допунити до 100 ml	4,6
17,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml бифталата, допунити до 100 ml	4,8
23,85 ml 0,1 N NaOH + 50 ml бифталата, допунити до 100 ml	5,0
29,95 ml 0,1 N NaOH + 50 ml бифталата, допунити до 100 ml	5,2
35,45 ml 0,1 N NaOH + 50 ml бифталата, допунити до 100 ml	5,4
39,85 ml 0,1 N NaOH + 50 ml бифталата, допунити до 100 ml	5,6
43,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml бифталата, допунити до 100 ml	5,8
45,45 ml 0,1 N NaOH + 50 ml бифталата, допунити до 100 ml	6,0
0,1 M монокалијум фосфат + 0,1 N NaOH на 20°C	
5,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml фосфата, допунити до 100 ml	6,0
8,60 ml 0,1 N NaOH + 50 ml фосфата, допунити до 100 ml	6,2
12,60 ml 0,1 N NaOH + 50 ml фосфата, допунити до 100 ml	6,4
17,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml фосфата, допунити до 100 ml	6,6
23,45 ml 0,1 N NaOH + 50 ml фосфата, допунити до 100 ml	6,8
29,63 ml 0,1 N NaOH + 50 ml фосфата, допунити до 100 ml	7,0
35,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml фосфата, допунити до 100 ml	7,2
39,50 ml 0,1 N NaOH + 50 ml фосфата, допунити до 100 ml	7,4
42,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml фосфата, допунити до 100 ml	7,6
45,20 ml 0,1 N NaOH + 50 ml фосфата, допунити до 100 ml	7,8
46,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml фосфата, допунити до 100 ml	8,0
0,1 M H3BO3 у 0,1 M KCl + 0,1 N NaOH на 20°C	
2,61 ml 0,1 N NaOH + 50 ml борне кис, допунити до 100 ml	7,8
3,97 ml 0,1 N NaOH + 50 ml борне кис, допунити до 100 ml	8,0

5,90 ml 0,1 N NaOH + 50 ml борне кис, допунити до 100 ml	8,2
8,50 ml 0,1 N NaOH + 50 ml борне кис, допунити до 100 ml	8,4
12,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml борне кис, допунити до 100 ml	8,6
16,30 ml 0,1 N NaOH + 50 ml борне кис, допунити до100 ml	8,8
21,30 ml 0,1 N NaOH + 50 ml борне кис, допунити до 100 ml	9,0
26,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml борне кис, допунити до 100 ml	9,2
32,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml борне кис, допунити до 100 ml	9,4
36,85 ml 0,1 N NaOH + 50 ml борне кис, допунити до 100 ml	9,6
40,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml борне кис, допунити до 100 ml	9,8
43,90 ml 0,1 N NaOH + 50 ml борне кис, допунити до 100 ml	10,0

Цитратни пуфери према Колтхофу и Влишховеру:

Састав	pH
0,1 M монокалијум цитрат и 0,1 N HCl на 18°C (*)	
49,7 ml 0,1 N HCl + 50 ml цитрата, допунити до 100 ml	2,2
43,4 ml 0,1 N HCl + 50 ml цитрата, допунити до 100 ml	2,4
36,8 ml 0,1 N HCl + 50 ml цитрата, допунити до 100 ml	2,6
30,2 ml 0,1 N HCl + 50 ml цитрата, допунити до 100 ml	2,8
23,6 ml 0,1 N HCl + 50 ml цитрата, допунити до 100 ml	3,0
17,2 ml 0,1 N HCl + 50 ml цитрата, допунити до 100 ml	3,2
10,7 ml 0,1 N HCl + 50 ml цитрата, допунити до 100 ml	3,4
4,2 ml 0,1 N HCl + 50 ml цитрата, допунити до 100 ml	3,6
0,1 M монокалијум цитрат и 0,1 N NaOH на 18°C[VII]	
2,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml цитрата, допунити до 100 ml	3,8
9,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml цитрата, допунити до 100 ml	4,0
16,3 ml 0,1 N NaOH + 50 ml цитрата, допунити до 100 ml	4,2
23,7 ml 0,1 N NaOH + 50 ml цитрата, допунити до 100 ml	4,4
31,5 ml 0,1 N NaOH + 50 ml цитрата, допунити до 100 ml	4,6
39,2 ml 0,1 N NaOH + 50 ml цитрата, допунити до 100 ml	4,8
46,7 ml 0,1 N NaOH + 50 ml цитрата, допунити до 100 ml	5,0
54,2 ml 0,1 N NaOH + 50 ml цитрата, допунити до 100 ml	5,2
61,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml цитрата, допунити до 100 ml	5,4
68,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml цитрата, допунити до 100 ml	5,6
74,4 ml 0,1 N NaOH + 50 ml цитрата, допунити до 100 ml	5,8
81,2 ml 0,1 N NaOH + 50 ml цитрата, допунити до 100 ml	6,0

Боратне смеше према Соренсену:

Састав	Соренсен,	Валбум, pH на		

боракс (ml)	HCl/NaOH (ml)	pH на 18°C	10°C	40°C	70°C
0,05 M боракс + 0,1 N HCl					
5,25	4,75	7,62	7,64	7,55	7,47
5,50	4,50	7,94	7,98	7,86	7,76
5,75	4,25	8,14	8,17	8,06	7,95
6,00	4,00	8,29	8,32	8,19	8,08
6,50	3,50	8,51	8,54	8,40	8,28
7,00	3,00	8,08	8,72	8,56.	8,40
7,50	2,50	8,80	8,84	8,67	8,50
8,00	2,00	8,91	8,96	8,77	8,59
8,50	1,50	9,01	9,06	8,86	8,67
9,00	1,00	9,09	9,14	8,94	8,74
9,50.	0,50	9,17	9,22	9,01	8,80
10,00	0,00	9,24	9,30	9,08	8,86
0,05 M боракс + 0,1 N NaOH					
10,0	0,0	9,24	9,30	9,08	8,86
9,0	1,0	9,36	9,42	9,18	8,94
8,0	2,0	9,5	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

Фосфатне смеше према Соренсену:

Састав	pH
0,0667 M монокалијум фосфат + 0,0667 M динатријум фосфат на 20°C	
99,2 ml KH2PO4 + 0,8 ml Na2HPO4	5,0
98,4 ml KH2PO4 + 1,6 ml Na2HPO4	5,2
97,3 ml KH2PO4 + 2,7 ml Na2HPO4	5,4
95,5 ml KH2PO4 + 4,5 ml Na2HPO4	5,6
92,8 ml KH2PO4 + 7,2 ml Na2HPO4	5,8
88,9 ml KH2PO4 + 11,1 ml Na2HPO4	6,0
83,0 ml KH2PO4 + 17,0 ml Na2HPO4	6,2
75,4 ml KH2PO4 + 24,6 ml Na2HPO4	6,4
65,3 ml KH2PO4 + 34,7 ml Na2HPO4	6,6
53,4 ml KH2PO4 + 46,6 ml Na2HPO4	6,8
41,3 ml KH2PO4 + 58,7 ml Na2HPO4	7,0
29,6 ml KH2PO4 + 70,4 ml Na2HPO4	7,2
19,7 ml KH2PO4 + 80,3 ml Na2HPO4	7,4
12,8 ml KH2PO4 + 87,2 ml Na2HPO4	7,6

7,4 ml KH2PO4 + 92,6 ml Na2HPO4	7,8
3,7 ml KH2PO4 + 96,3 ml Na2HPO4	8,0

_____

VI Вредности pH дате у овој табели израчунате су Соренсеновим стандарним једначинама (1909). Одговарајуће pH вредности су за 0,04 pH јединица веће од вредности датих у табели.

VII Додати мали кристал тинола или сличне супстанце да се спречи раст плесни.

C.8. ТОКСИЧНОСТ ЗА КИШНЕ ГЛИСТЕ: МЕТОДА ИСПИТИВАЊА СА ВЕШТАЧКИМ ЗЕМЉИШТЕМ

Део први

1. МЕТОДА ИСПИТИВАЊА

1.1. УВОД

У овој лабораторијској методи испитивања, испитивана супстанца додаје се у вештачко земљиште у које се смештају кишне глисте. Након 14 дана (или по избору након 7 дана) испитује се летално дејство супстанце на кишне глисте. Ово испитивање представља поступак којим се у релативно кратком року може стећи увид у дејство хемикалија на кишне глисте, код дермалног и оралног уноса супстанце.

1.2. ДЕФИНИЦИЈА

LC_{50} јесте концентрација супстанце која изазива смрт 50% испитиваних јединки у току унапред утврђеног периода излагања.

1.3. РЕФЕРЕНТНЕ СУПСТАНЦЕ

Референтна супстанца се користи повремено као средство којим се показује да није дошло до значајних промена осетљивости тест система.

Као референтна супстанца препоручује се хлорацетамид аналитичке чистоће.

1.4. ПРИНЦИП МЕТОДЕ

Земљиште је променљив медијум, те се за ову методу користи прецизно дефинисано вештачко земљиште које садржи иловачу. Одрасле јединке кишних глиста врсте *Eisenia foetida* (видети белешку у Делу другом ове методе) држе се у дефинисаном вештачком земљишту третираном различитим концентрацијама испитиване супстанце. Четрнаест дана (може и 7 дана) након почетка испитивања, садржај посуде из сваке есперименталне групе истресе се у плитку лабораторијску кадицу и преброје се преживеле кишне глисте.

1.5. КРИТЕРИЈУМИ КВАЛИТЕТА

Метода је осмишљена тако да је максимално поновљива, с обзиром на земљишни супстрат и испитиване организме. Да би испитивање било прихваћено, смртност у контролама не сме премашити 10% на крају испитивања.

1.6. ОПИС МЕТОДЕ

1.6.1. Материјал

1.6.1.1. Земљишни супстрат

Као основни испитивани супстрат користи се тачно дефинисано вештачко земљиште.

Основни супстрат (проценти на бази суве масе) садржи:

– 10% тресета (вредности pH што је могуће ближе 5,5 до 6,0, без видљивих остатака биљака, ситно млевен);

– 20% каолинска глина са, ако је могуће, више од 50% каолина;

– око 69% индустријског кварцног песка (претежно ситни песак са више од 50% честица величине 0,05 mm до 0,2 mm). Ако се супстанца не може довољно добро дисперговати у води, оставити 10 g по сандуку да би се касније помешало са испитиваном супстанцом;

– око 1% калцијум карбоната ($CaCO_3$), спрашеног, хемијски чистог, додаје се за корекцију pH вредности на 6,0 ± 0,5.

Испитивани супстрат садржи:

– основни супстрат,

– испитивану супстанцу и

– дејонизовану воду.

Садржај воде износи око 25% до 42% суве масе основног супстрата. Садржај воде у супстрату одређује се сушењем узорка до сталне тежине на температури од 105° C. Кључни критеријум је да вештачко земљиште буде овлажено до тачке у којој нема задржавања воде. Током мешања се пази да се добије равномерна расподела испитиване супстанце и супстрата. Описује се начин на који се испитивана супстанца додаје у супстрат.

Контролни супстрат садржи:

– основни супстрат и

– воду.

Ако се користи адитив, додатна контрола садржи исту количину адитива.

1.6.1.2. Експерименталне посуде

Стаклена посуда запремине око 1 L (прописно покривена пластичним поклопцем, сахатним стаклом или пластичном фолијом са отворима за вентилацију) напуњена испитиваним и контролним супстратом у количини еквивалентној 500 g суве масе супстрата.

1.6.2. Услови у току испитивања

Експерименталне посуде држати у клима коморама на температури од 20° C ± 2° C са сталним осветљењем. Интензитет светла да буде између 400 lux и 800 lux.

Испитивање траје 14 дана, али се смртност процењује и 7 дана након почетка испитивања.

1.6.3. Поступак методе испитивања

Испитиване концентрације

Концентрације испитиване супстанце изражавају се као маса супстанце по сувој маси супстрата (mg/kg).

Прелиминарна студије за утврђивање опсега концентрација

Опсег концентрација које доводе до смртности од 0% до 100% може се одредити студијом за утврђивање опсега да би се добила информација о опсегу концентрација које ће се користити у дефинитивном испитивању.

Супстанца се испитује у следећим концентрацијама: 1.000 mg; 100 mg; 10 mg; 1 mg и 0,1 mg супстанце по килограму супстрата (сува маса).

Ако се ради коначно испитивање, по једна испитивана група од по 10 глиста по концентрацији и једна група по контроли, могу бити довољне за студију утврђивања опсега концентрација.

Коначно испитивање

Резултати студије за утврђивање опсега концентрација користе се за избор најмање 5 концентрација у геометријском низу са фактором не већим од 1,8. Изабране концентрације обухватају опсег смртности од 0% до 100%.

Испитивање серија концентрација треба да омогући што прецизнију процену вредности LC_{50} и одговарајућих интервала поверења.

У дефинитивном испитивању користе се најмање четири екпериментaлне групе од по 10 глиста по концентрацији и контроли. Резултати третмана приказују се као средња вредност из 4 групе са стандардном девијацијом.

Кад две узастопне концентрације, при фактору од 1,8 резултирају 0% и 100% смртношћу, те две вредности су довољне да покажу опсег у којем се налази LC_{50}.

Мешавина основног испитиваног супстрата и испитиване супстанце

Испитивани супстрат кад год је могуће припрема се изузимајући воду, без и једног додатног агенса. Непосредно пре почетка испитивања, емулзија или дисперзија испитиване супстанце у дејонизиованој води или другом растварачу меша се са основним испитиваним супстратом или се равномерно распрши по супстрату помоћу хроматографског или сличног распршивача за фино распршивање.

Ако није растворљива у води, испитивана супстанца може се растворити у најмањој могућој запремини одговарајућег органског растварача (нпр. хексана, ацетона или хлороформа). Само средства која брзо испаравају могу се користити за растварање, дисперзију или емулговање испитиване супстанце. Испитивана супстанца се пре употребе проветрава. Количина воде која испари надокнађује се. Контрола садржи исту количину сваког употребљеног додатног средства.

Ако испитивана супстанца није растворљива или се не може дисперговати или емулговати у органским растварачима, 10 g мешавине ситно самлевеног кварцног песка и количина испитиване супстанце потребна за третман 500 g суве масе вештачког земљишта помеша се са 490 g суве масе испитиване супстанце.

У свакој групи, у сваку посуду ставља се влажан испитивани супстрат у количини еквивалентној 500 g суве масе, а затим се на површину супстрата ставља по 10 кишних глиста по посуди. Глисте су претходно аклиматизоване у току 24 сата у слично влажном, основном суптрату, а затим брзо испране. Пре стављања у испитивани супстрат, сувишна вода са глиста упије се филтер папиром.

Експерименталне посуде покрију се перфорираним пластичним поклопцима, сахатним стаклом или фолијом, да би се спречило сушење супстрата. Посуде се држе 14 дана у условима прописаним методом.

Смртност се процењује 14 (опционо 7) дана након почетка. Супстрат се проспе у плитак стаклени суд од нерђајућег челика. Кишне глисте се прегледају и одреди се број преживелих глиста. Кишне глисте сматрају се мртвим ако не одговарају на нежан механички надражај на предњем крају.

Када се смртност процењује након 7 дана, посуда се поновно напуни супстратом и преживеле глисте се врате на површину истог испитиваног супстрата.

1.6.4. Испитивани организми

Испитивани организми су одрасле јединке *Eisenia foetida* (видети Део други ове методе), старе најмање два месеца са клителумом, пуне тежине између 300 mg и 600 mg (за поступак узгајања видети Део други ове методе).

2. ПОДАЦИ

2.1. ОБРАДА И ПРОЦЕНА РЕЗУЛТАТА

Концентрација испитиване супстанце наводи се у односу на одговарајуће проценте мртвих кишних глиста.

Кад су подаци добри, вредност LC_{50} са интервалима поверења (p = 0,05) може се одредити помоћу стандардних метода (видети у литератури[4]). LC_{50} се изражава у mg испитиване супстанце по килограму испитиваног супстрата (сува маса).

У случајевима када је нагиб криве дозне зависности превише стрм да би се могла израчунати LC_{50}, довољна је графичка процена те вредности.

Кад две узастопне концентрације при фактору од 1,8 доводе само до 0% и 100% смртности, те две вредности су довољне да покажу опсег у којем се налази LC_{50}.

3. ИЗВЕШТАЈ

Извештај о испитивању, ако је могуће, садржи:

– изјаву да је испитивање изведено у складу са наведеним критеријима квалитета;

– податак које је испитивање изведено (прелиминарна студија за утврђивање опсега концентрација или дефинитивно испитивање);

– тачан опис услова у току испитивања или изјаву да је испитивање било изведено у складу са поступком (наводи се свако одступање);

– тачан опис начина на који је испитивана супстанца умешана у основни супстрат;

– податке о испитиваним организмима (врста, старост, средња вредност и опсег тежине, услови држања и узгајања, снабдевач);

– податак о методи коришћеној за одређивање LC_{50};

– резултате испитивања, укључујући све употребљене податке;

– опис примећених симптома или промена у понашању испитиваних организама;

– смртност у контролама;

– LC_{50} или највишу испитивану концентрацију без смртности и најнижу испитивану концентрацију са смртношћу од 100%, 14 дана (и по избору 7 дана) од почетка испитивања;

– графички приказ криве концентрација/одговор;

– резултате добијене са референтном супстанцом (у вези са овим испитивањем или из претходних испитивања контроле квалитета).

4. ЛИТЕРАТУРА

1. OECD, Paris, 1981, Test Guideline 207, Decision of the Council C(81)30 final.

2. Edwards, C. A. and Lofty, J. R., 1977, Biology of Earthworms, Chapman and Hall, London, p. 331.

3. Bouche. M. B., 1972, Lombriciens de France, ECOlogie et Systematique, Institut National de la Recherche Agronomique, p. 671.

4. Litchfield, J. T. andWilcoxon, F., A simplified method of evaluation dose effect experiments. I. Pharm. Exp. Therap., vol.

96, 1949, p. 99.

5. Commission of the European Communities, Development of a standardised 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, Ökotoxikologie, ecomed, Landsberg, 1986.

Део други
УЗГАЈАЊЕ И ЧУВАЊЕ ГЛИСТА ПРЕ ИСПИТИВАЊА

За узгајање животиња, 30 до 50 одраслих глиста стави се у сандук за узгајање са свежим супстратом из кога се изваде након 14 дана. Глисте се могу употребити за узгајање даљих одгајивачких група. Кишне глисте које се излегу из кокона користе се у испитивањима кад одрасту (у преписаним условима након два до три месеца).

УСЛОВИ ДРЖАЊА И УЗГОЈА

Услови за држање и узгој животиња су:

Клима комора: температура 20° C ± 2° C, ако је могуће са сталним осветљењем (интензитета 400 lux до 800 lux).

Сандуци за узгој: погодни плитки сандуци запремине од 10 L до 20 L.

Супстрат: *Eisenia foetida* може се узгајати у екскременту различитих животиња. Као супстрат се препоручује мешавина тресета (50% запремине) и кравље или коњске балеге (50% запремине). Супстрат има вредност pH око 6 до 7 (регулише се калцијум карбонатом) и ниску јонску проводљивост (мање од 6 mmhos или 0,5% концентрације соли). Супстрат треба да буде влажан, али не превише мокар.

Уз описани поступак могу се успешно користити и друге процедуре.

Напомена: Постоје два типа глиста *Eisenia foetida* које су таксономи раздвојили у две врсте (Vouche, 1972). Морфолошки су сличне, али једна врста(*Eisenia foetidafoetida*) има на сегментима типичне попречне пруге или прстенове, док их друга врста(*Eisenia foetida andrei)* нема, односно има црвенкасте шаре. Кад год је могуће, користити врсти *Eisenia foetida andrei*. Остале врсте могу се користити ако је на располагању потребна методологија.

C.9. БИОРАЗГРАДЊА – ZAHN-WELLENS МЕТОДА ИСПИТИВАЊА

1.1. УВОД

Циљ ове методе је процена могућности потпуне биоразградљивости добро растворљивих, неиспарљивих органских супстанци на које делују микроорганизми у релативно високим концентрацијама у испитивању у статичким условима.

Приликом тумачења резултата узети у обзир могућност физичко-хемијске адсорпције на суспендоване материје (видети одељак 3.2. ове методе).

За концентрације испитиване супстанце узимају се концентрације које кореспондирају вредностима за концентрацију растворeног органског угљеника(у даљем тексту: DOC) у опсегу од 50 mg/l до 400 mg/l или вредностима за хемијску потрошњу кисеоника(у даљем тексту: ХПК) у опсегу од 100 mg/lдо 1.000 mg/l. Испитивање овако релативно високих концентрација повећава аналитичку поузданост. Једињења са токсичним својствима могу успорити и инхибирати процес разградње.

У овој методи, DOC или ХПК користи се за процену потпуне биоразградљивости испитиване супстанце.

Упоредно извођење специфичних аналитичких метода може дати процену примарне биоразградљивости супстанци (нестанак полазне супстанце).

Метода се може применити само за органске супстанце које, при концентрацијама које се користе у испитивању:

– јесу растворљиве у води у условима дефинисаним овом методом;

– имају незнатан напон паре у условима дефинисаним овом методом;

– не делују инхибиторно на бактерије;

– које се адсорбују се унутар система само у ограниченој мери;

– не образују пену.

Подаци о пропорционалном уделу главних састојака испитиване супстанце корисни су при тумачењу добијених резултата, нарочито у случајевима где су вредности добијених резултата ниске или екстремне.

Подаци о токсичности испитиване супстанце на микроорганизме пожељни су за тумачење ниских добијених вредности и приликом избора одговарајућих концентрација за потребе испитивања.

1.2. ДЕФИНИЦИЈЕ И МЕРНЕ ЈЕДИНИЦЕ

Степен разградње који се достигне на крају испитивања описује се као биоразградљивост у Zahn-Wellens испитивању:

$$D_t = \left[1 - \frac{C_T - C_B}{C_A - C_{BA}}\right] \times 100$$

при чему:

D_t јесте проценат биоразградње (%) у времену T;

C_A јесте DOC (или ХПК) вредност измерена у испитиваној смеши 3 сата након почетка испитивања (mg/l);

C_t јесу DOC или ХПК вредности измерене у испитиваној смеши у времену t (mg/l);

C_B јесу DOC или ХПК вредности измерене у контроли у времену t (mg/l);

C_{BA} јесу DOC или ХПК вредности измерене у контроли, три сата након почетка испитивања (mg/l).

Степен разградње изражава се у процентима без децимала.

Проценат разградње јесте проценат смањења вредности DOC (или ХПК) за дату супстанцу.

Разлика између вредности измерене након три сата и израчунате вредности, или ако је могуће измерене почетне вредности, може дати користан податак о елиминацији супстанце (видети одељак 3.2. ове методе).

1.3. РЕФЕРЕНТНЕ СУПСТАНЦЕ

Коришћење референтних супстанци може бити од користи када се испитују нове супстанце. Још увек се не могу препоручити одређене референтне супстанце.

1.4. ПРИНЦИП МЕТОДЕ

Активни муљ, неорганski нутријенти и испитивана супстанца у воденом раствору као једини извор угљеника сједињују се, стављају у стаклену посуду запремине један до четири литра са мешалицом и аератором. Ова смеша се меша и аерише на температури од 20° C до 25° C под дифузним осветљењем или у мрачној комори у току 28 дана. Процес разградње прати се одређивањем вредности DOC (или ХПК) у филтрату смеше са једнодневном или одговарајућом редовном динамиком. Однос вредности DOC (или ХПК) измерене након сваког временског интервала и вредности DOC (или ХПК) измерене три сата након почетка испитивања изражава се као проценат биоразградње и служи као мера степена разградње у датом времену. Ова вредност се графички приказује у функцији времена како би се добила крива биолошке разградње.

Кад се користи специфична аналитичка метода, могу се мерити промене у концентрацији полазне супстанце до којих долази услед биоразградње (примарна биоразградљивост).

1.5. КРИТЕРИЈУМИ КВАЛИТЕТА

Поновљивост методе испитивања је доказана интеркалибрацијским испитивањима.

Осетљивост методе је у великој мери одређена варијабилношћу резултата слепе пробе и у мањој мери, прецизношћу одређивања концентрације растворeног органског угљеника и количини растворене испитиване супстанце

1.6. ОПИС МЕТОДЕ

1.6.1. Припреме

1.6.1.1. Реагенси

Вода: вода за пиће са садржајем органског угљеника < 5 mg/l. Збирна концентрација јона калцијума и магнезијума не сме бити већа од 2,7 mmol/l; у супротном, потребно је направити одговарајуће разблаживање са дејонизиваном или дестилованом водом.

Сумпорна киселина, аналитичке чистоће: 50 g/l.

Раствор натријум-хидроксида, аналитичке чистоће: 40 g/l.

Раствор неорганских нутријената (растворити у 1 L дејонизоване воде):

– NH_4Cl (амонијум-хлорид), аналитичке чистоће: 38,5 g;

– NaH_2PO_4Í$2H_2O$ (натријум дихидрогенфосфат), аналитичке чистоће: 33,4 g;

– KH_2PO_4(калијум-хидрогенфосфат), аналитичке чистоће: 8,5 g;

– K_2HPO_4 (дикалијум-хидрогенфосфат), аналитичке чистоће: 21,75 g.

Смеша служи као раствор нутријената и као пуферски раствор.

1.6.1.2. Опрема

Опрема за испитивање садржи:

– стаклене посуде запремине од 1 L до 4 L (нпр. цилиндричне посуде);

– мешалицу са стакленом или металном лопатицом на одговарајућој осовини (лопатица се ротира на 5 cm до 10 cm изнад дна посуде). Користи се и магнетна мешалица са магнетом за мешање 7 cm до 10 cm;

– стаклену цевчицу са унутрашњим пречником 2 mm до 4 mm за аерацију. Отвор цевчице да буде постављен на око 1 cm изнад дна посуде;

– центрифугу (око 3.550 g);

– pH-метар;

– оксиметар;

– филтер папир;

– уређај за мембранску филтрацију;

– мембранске филтере, промера пора 0,45 mm. Мембрански филтери су погодни уколико је онемогућено ослобађање угљеника из филтер папира или адсорбовање испитиване супстанце у току филтрације;

– аналитичку опрему за одређивање садржаја органског угљеника и хемијске потрошње кисеоника.

1.6.1.3. Припрема инокулума

Активни муљ из постројења за биолошку обраду испира се (у више понављања) центрифугирањем или таложењем у води која се користи за потребе испитивања.

Активни муљ је потребно да буде у одговарајућем стању. Такав муљ се добија из постројења за обраду отпадних вода која исправно раде. Да би се добило што више различитих врста или сојева бактерија, пожељно је мешање инокулума из различитих извора (нпр. из различитих постројења за обраду, из екстраката земљишта, из воде из река итд). Мешавина инокулума даље се третира на наведени начин.

За проверу активности активног муља видети одељак „Функционална контрола” из ове методе.

1.6.1.4. Припрема испитиваних раствора

У посуду додати: 500 ml воде која се користи за потребе испитивања, 2,5 ml/l раствора неорганских нутријената и активни муљ у количини која кореспондира 0,2 до 1,0 g суве материје/l у крајњој смеши. Додати довољну количину основног раствора испитиване супстанце тако да се успостави вредност DOC 50 mg/lдо 400 mg/l у крајњој смеши. Кореспондирајуће вредности за ХПК су 100 mg/l до 1.000 mg/l. Допунити посуду са водом која се користи за потребе испитивања до запремине 1 L или 4 L (у зависности од запремине посуде). Запремина раствора зависи од броја узорака потребних за одређивање вредности DOC или ХПК, као и запремина узорака потребних за аналитичка мерења.

Запремина од 2 L може се сматрати задовољавајућом. За сваку концентрацију испитиване супстанце паралелно се постави минимум једна контрола, која садржи само активни муљ и раствор неорганских нутријената у једнакој запремини воде као у осталим посудама.

1.6.2. Извођење испитивања

Раствори испитиване супстанце мешају се на магетној мешалици или мешалици са лопатицом под дифузним осветљењем или у мрачној комори на температури 20° C до 25° C. Аерација се обавља помоћу компримованог ваздуха који се пречишћава помоћу стаклене вуне и помоћу шприц-боце уколико се укаже потреба. Потребно је онемогућити таложење муља и пад концентрација кисеоника испод 2 mg/l.

Вредност pH се проверава у једнаким временским интервалима (нпр. дневно) и да се по потреби подеси на pH вредности од 7 или 8.

Губици услед испаравања надокнађују се додавањем потребне количине дејонизоване или дестиловане воде непосредно пре сваког узимања узорака. Пожељно је пре почетка испитивања означити ниво течности у посуди. Нове ознаке нивоа течности стављају се на посуду након сваког узимања узорака (без аерацијског сувог мешања). Први узорци се увек узимају три сата након почетка испитивања да би се одредило да ли се испитивана супстанца адсорбује на активни муљ

Разградња испитиване супстанце прати се одређивањем вредности DOC које се ради свакодневно или у одређеним редовним временским интервалима. Узорци из експерименталних посуда и контролних посуда филтрирају се кроз пажљиво опран филтер папир. Првих 5 ml филтрата раствора се одбацује. Активни муљ који је тешко филтрирати може се претходно уклонити центрифугирањем 10 минута. Одређивање вредности DOC или ХПК ради се најмање у два понављања. Испитивање се изводи у трајању до 28 дана.

Напомена: Филтрати који остају замућени даље се филтрирају кроз мембранске филтере. Мембрански филтери не смеју отпуштати или адсорбовати ниједну врсту органског материјала.

Контрола активног муља

Упоредо са сваком серијом концентрација испитиване супстанце поставља се паралелно испитивање да би се проверила активност активног муља. За ову намену се диетиленгликол показао корисним.

Адаптација

Уколико се мерења обављају у релативно кратким интервалима (нпр. свакодневно), адаптираност се може јасно уочити из криве разградње (видети Слику 2). Испитивање не треба започети непосредно пред викенд.

Ако адаптираност наступи на крају периода, испитивање се може продужити све док се не заврши разградња.

Напомена: Ако је потребно знати више о понашању адаптираног муља, исти активни муљ се још једном третира истом испитиваном супстанцом у складу са поступком:

Искључити мешалицу и аератор и оставити да се активни муљ исталожи. Одстранити супернатант, напунити посуду до 2 L запремине са водом, мешати 15 минута и поновно оставити муљ да се исталожи. Након што се супернатант поновно одстрани, исталожени муљ се поново третира истом испитиваном супстанцом у складу са одељцима 1.6.1.4. и 1.6.2. ове методе. Активни муљ се може исталожити и центрифугирањем.

Адаптирани муљ може да се меша са свежим муљем до концентрације 0,2 g до 1 g суве тежине/l.

Опрема за аналитичка мерења

Узорци се филтрирају кроз пажљиво опрани филтер папир (за прање се користи дејонизована вода).

Филтрати који остају замућени филтрирају се кроз мембранске филтере промера 0,45 µm.

Вредност DOC одређује се у два понављања у филтратима узорака (првих 5 ml се одбацује) помоћу TOC инструмента. Ако се филтрат не може анализирати истог дана, чувати га у фрижидеру до следећег дана. Не препоручује се чување материјала дуже време.

ХПК се одређује у филтратима узорка према поступку описаном у литератури[2].

2. ПОДАЦИ И ПРОЦЕНА

Вредност DOC, односно ХПК се одређује најмање у два понављања у узорцима у складу са смерницама датим у одељку 1.6.2. Разградња у времену t израчунава се према формули (са дефиницијама) датим у одељку 1.2.

Степен разградње који се достигне на крају испитивања се описује као „биоразградљивост у Zahn-Wellens испитивању".

Напомена: Ако се потпуна разградња достигне пре краја испитивања и ако се овај резултат потврди и у другом наврату наредног дана, испитивање се може прекинути.

3. ИЗВЕШТАЈ

3.1. ИЗВЕШТАЈ О ИСПИТИВАЊУ

Извештај о испитивању, ако је могуће, садржи:

– почетну концентрацију испитиване супстанце;

– све остале податке и резултате испитивања супстанце, референтне супстанце(уколико је коришћена) и слепе пробе;

– концентрацију испитиване супстанце након три сата;

– биоразградњу(крива са описом);

– датум и место где су узети организми који су коришћени у испитивању, ниво адаптираности активног муља, коришћене концентрације, итд;

– научно утемељене разлоге за евентуалне промене у извођењу испитивања.

3.2. ТУМАЧЕЊЕ РЕЗУЛТАТА

Постепено смањење вредности DOC (ХПК) које се региструје у току неколико дана или седмица јесте показатељ да је испитивана супстанца биоразградљива.

На испитивање може да утиче физичко-хемијска адсорпција. То је случај када се у току прва три сата испитивања, региструје потпуно или делимично смањење вредности DOC (ХПК), а разлика у нивоу течности између испитиване групе и контролне групе остаје незнатна.

Потребно је извести додатна испитивања за разграничавање процеса биоразградње (или парцијалне биоразградње) од процеса адсорпције. Најпоузданији начин да се то уради је да се у поставци испитивања(најбоље респирометријско испитивање), као инокулум употребе супернатант или муљ.

Супстанце су потенцијално биоразградљиве, ако се у испитивању региструје значајно смањење вредности DOC (ХПК) које није последица адсорпције. Делимично смањење вредности DOC (ХПК), које није последица адсорпције, указује на то да је испитивана супстанца биоразградљива у одређеној мери. Незнатно или нулта вредност смањења DOC (ХПК) може бити последица инхибиторног деловања испитиване супстанце на микроорганизме, што се примећује по замућењу супернатанта. У том случају испитивање поновити са нижим концентрацијама испитиване супстанце.

Прецизнији резултати добијају се употребом најподесније аналитичке методе. Када се у испитивању користи обележавање изотопом C^{14}, образовање $C^{14}O_2$ потврђује да је дошло до биоразградње испитиване супстанце.

Кад су резултати приказани у смислу примарне биоразградње, ако је могуће, објаснити промену хемијске структуре која узрокује смањење количине полазне супстанце.

Потврда аналитичке методе приказује се заједно са одговором добијеним са слепом пробом (само медијум, без активног муља).

4. ЛИТЕРАТУРА

1. OECD, Paris, 1981, Test Guideline 302 B, Decision of the COuncil C(81) 30 final.

2. Annex V C.9 Degradation: Chemical Oxygen Demand, COmmission Directive 84/449/EEC, (OJ L 251,19.9.1984, p. 1).

Део други
ПРИМЕР ПРОЦЕНЕ

Органско једињење: 4-етоксибензоева киселина

Теоријска концентрација: 600 mg/l

Теоријска DOC вредност: 390 mg/l

Инокулум постројење за обраду отпадне воде из домаћинстава

Концентрација: 1 g/l суве материје

Адаптираност: није адаптиран

Испитивање: одређивање DOC вредности

Количина узорка: 3 ml

Контролна супстанца: диетиленгликол

Токсичност једињења: Нема токсичног ефекта у концентрацији испод 1.000 mg/l

Примењено испитивање: тест ферментације

Трајање испи-тивања	Контролна супстанца				Испитивана супстанца		
	Слепа проба DOC (1) (mg/l)	DOC (1) (mg/l)	DOC нето (mg/l)	Раз-градња (%)	DOC (1) (mg/l)	DOC нето (mg/l)	Раз-градња (%)
0	-	-	300,0	-	-	390,0	-
3 сата	4,0	298,0	294,0	2	371,6	367,6	6
1 дан	6,1	288,3	282,2	6	373,3	367,2	6
2 дана	5,0	281,2	276,2	8	360,0	355,0	9
5 дана	6,3	270,5	264,2	12	193,8	187,5	52
6 дана	7,4	253,3	245,9	18	143,9	136,5	65
7 дана	11,3	212,5	201,2	33	104,5	93,2	76
8 дана	7,8	142,5	134,7	55	58,9	51,1	87
9 дана	7,0	35,0	28,0	91	18,1	11,1	97
10 дана	18,0	37,0	19,0	94	20,0	2,0	99
(1) Средња вредност од три мерења							

Слика 1: Пример криве биоразградње

Слика 2: Пример адаптације активног муља

C.10. БИОРАЗГРАДЊА – ИСПИТИВАЊЕ СИМУЛАЦИЈЕ АКТИВНОГ МУЉА

1. МЕТОДА ИСПИТИВАЊА

1.1. УВОД

1.1.1. Опште напомене

Метода се примењује само на органске супстанце у концентрацијама које се користе у испитивању:

– растворљиве у води за припрему раствора;

– имају незнатан напон паре у условима дефинисаним овом методом;

– не делују инхибиторно на бактерије.

Подаци о процентуалном уделу главних састојака испитиване супстанце корисни су за тумачење добијених резултата, посебно у случајевима где су вредности добијених резултата ниске или екстремне.

Пожељно је имати податке о токсичности испитиване супстанце за тумачење ниских добијених вредности и приликом избора одговарајућих концентрација за потребе испитивања.

1.1.2. Одређивање потпуне биоразградљивости (DOC/ХПК анализа)

Циљ методе је одређивање потпуне биолошке разградљивости што је одређено уклањањем испитиване супстанце и њених метаболита из система који симулира постројење са активним муљем, при концентрацији која одговара вредности > 12 mg DOC/l (или приближно 40 mg ХПК/l). Оптималном вредношћу сматра се 20 mg DOC/l (DOC јесте концентрација растворeног органског угљеника, ХПК јесте хемијска потрошња кисеоника).

Потребно је утврдити садржај органског угљеника (или ХПК) испитиваног материјала.

1.1.3. Одређивање примарне биоразградљивости (специфична анализа)

Циљ ове методе је одређивање примарне биоразградљивости испитиване супстанце у систему који симулира постројење са активним муљем, при концентрацији испитиване супстанце од приближно 20 mg/l, помоћу специфичне аналитичке методе

(нижа или виша концентрација испитиване супстанце може се користити уколико је могуће применити изабрану аналитичку методу и уколико испитивана супстанца у датим концентрацијама не испољава токсично дејство). Ова анализа омогућава процену примарне биоразградљивости испитиване супстанце (нестанак полазне хемијске супстанце).

Циљ методе није одређивање минерализације испитиване супстанце.

Потребно је да буде доступна одговарајућа аналитичка метода за одабрану испитивану супстанцу.

1.2. ДЕФИНИЦИЈЕ И МЕРНЕ ЈЕДИНИЦЕ

1.2.1. DOC/ХПК анализа

Степен уклањања испитиване супстанце се израчунава формулом:

$$DR = \frac{T-(E-E_0)}{T} \times 100\% \qquad (1(a))$$

при чему:

DR јесте степен уклањања испитиване супстанце изражен у процентима DOC (или ХПК) након унапред одређеног ретенционог периода;

T јесте концентрација испитиване супстанце у инфлуенту изражена у mg DOC/l (или у mg HPK/l);

E јесте концентрација DOC (или ХПК) у ефлуенту изражена у mg DOC/l (или у mg HPK/l);

E_0 јесте концентрација DOC (или ХПК) у ефлуенту у контроли изражена у mg DOC/l (или у mg HPK/l).

Разградња јесте проценат смањења DOC (или ХПК) испитиване супстанце након унапред одређеног ретенционог периода

1.2.2. Специфична анализа

Проценат уклањања испитиване супстанце из водене фазе (R_w) након унапред одређеног времена ретенције израчунава се формулом:

$$R_w = \frac{C_I - C_O}{C_I} \times 100\% \qquad (1(b))$$

при чему:

C_I јесте концентрација испитиване супстанце у инфлуенту система (изражена у mg/l, одређено специфичном анализом);

C_O јесте концентрација испитиване супстанце у ефлуенту система (изражена у mg/l, одређено специфичном анализом).

1.3. РЕФЕРЕНТНЕ СУПСТАНЦЕ

Референтне супстанце за ову методу испитивања нису одређене.

1.4. ПРИНЦИП МЕТОДЕ ИСПИТИВАЊА

За одређивање потпуне биоразградљивости, упоредо се изводе два испитивања у два система (OECD потврдно испитивање или испитивање са порозним посудама). Испитивана супстанца додаје се инфлуенту једног система (синтетичка отпадна вода или комунална отпадна вода), док се у други систем уводи само инфлуент. За одређивање примарне биоразградње специфичном анализом у инфлуенту и ефлуенту, користи се само један систем.

DOC (или ХПК) концентрације мере се у ефлуенту или се концентрација испитиване супстанце одређује специфичним анализама.

DOC из испитиваног материјала се не мери, већ се само наведе.

Кад се одређују вредности DOC (или ХПК) сматра се да разлика између средње вредности концентрација у ефлуенту у контроли и ефлуенту у третману потиче од неразграђене испитиване супстанце

Кад се изводе специфичне анализе, мери се промена у концентрацији полазне супстанце (примарна биоразградљивост).

Системи могу да се поставе као системи спојених јединица, уз процедуру трансинокулације.

1.5. КРИТЕРИЈУМИ КВАЛИТЕТА

Почетна концентрација испитиване супстанце зависи од врсте примењене анализе и њених ограничења.

1.6. ОПИС МЕТОДЕ ИСПИТИВАЊА

1.6.1. Припрема

1.6.1.1. Опрема

Потребно је располагати са пар система истог типа, осим кад се изводе специфичне анализе. Користе се два типа система:

OECD потврдно испитивање

Опрема (видети Део други ове методе) се састоји од спремника (A) за синтетичке отпадне воде, пумпе за дозирање (B), аератора (C), сепаратора (D), пумпе за рециркулацију активног муља (E) и колектора за третирани ефлуент (F).

Посуде (A) и (F) су од стакла или погодног пластичног материјала, запремине најмање 24 L. Пумпа за дозирање (B) обезбеђује сталан доток синтетичких отпадних вода у аератор. Користи се било који погодни систем ако су обезбеђени константан доток и концентрација. Током нормалног рада система отвор сепаратора (D) је позициониран тако да аератор прими запремину од 3 испитиване смеше. Перфорирани дифузер ваздуха (G) је постављен у аератор (C) на средини конусног дна. Количина ваздуха која се удувава у аератор прати се помоћу мерача протока.

Пумпа за рециркулацију активног муља (E) постављена је тако да се активни муљ из сепаратора непрекидно рециркулише у посуду за аерацију (C).

„Порозна посуда”

Порозна посуда је направљена од плоча порозног полиетилена (2 mm дебљине, максимални промер поре је 95 mм), које су обликоване у цилиндре пречника 14 cm са конусном базом под углом од 45° (Део други Слике 1 и 2). Порозна посуда налази се у непропусној посуди од одговарајуће пластике, пречника 15 cm, са отвором на висини од 17,2 cm на цилиндричном делу, који одређује запремину (3 L) у лонцу. Чврсти потпорни прстен, направљен од одговарајуће пластике, постављен је око врха унутрашње посуде, тако да између унутрашње и спољашње посуде постоји простор од 0,5 cm.

Порозна посуда се може поставити у водено купатило. У основи унутрашње посуде су постављени дифузери који обезбеђују доток ваздуха.

Посуде (A) и (E) су од стакла или одговарајуће пластике, запремине најмање 24 L. Пумпа за рециркулацију активног муља (B) омогућава стални ток синтетичке отпадне воде у аератор. Користи се било који погодан систем ако су обезбеђени сталан доток и концентрација.

Треба имати резервне унутрашње порозне посуде уколико у току рада система дође до запушења. Запушене посуде потапају се у раствор хипохлорита, а затим се темељно исперу водом из чесме.

1.6.1.2. Филтрација

Користи се опрема за мембранску филтрацију и мембрански филтери промера 0,45 mм. Води се рачуна да се угљеник не ослобађа из мембранских филтера и да се испитивана супстанца не адсорбује у току филтрације.

1.6.1.3. Отпадна вода

Користити се погодна синтетичка или комунална отпадна вода.

Пример синтетичке отпадне воде

У једном литру воде из чесме раствори се:

– 160 mg пептона,

– 10 mg меснод екстракта,

– 30 mg урее,

– 7 mg NaCl,

– 4 mg $CaCl_2 \times 2H_2O$,

– 2 mg $MgSO_4 \times 7H_2O$ и

– 28 mg K_2HPO_4.

Комунална отпадна вода

Узима се отпадна вода која се прелива из примарног таложника из постројења која доминантно прерађују комуналне отпадне воде.

1.6.1.4. Основни раствор испитиване супстанце

Основни раствор испитиване супстанце, нпр. 1%, припрема се пре извођења испитивања. Концентрација испитиване супстанце се дефинише, како би се додала одговарајућа запремина основног раствора у отпадну воду или директно у систем.

1.6.1.5. Инокулум

Напомена: Кад се користи комунална отпадна вода, не користи се инокулум са ниском концентрацијом бактерија, али

може да се користи активни муљ.

Могу се користити разни инокулуми. У овој методи дата су три примера погодних инокулума: инокулум из секундарног ефлуента, композитни и инокулум активног муља.

Инокулум из секундарног ефлуента

Инокулум се узима из секундарног ефлуента задовољавајућег квалитета прикупљеног из постројења за обраду доминантно комуналних отпадних вода. Током периода од узимања ефлуента до његове употребе, ефлуент се чува у аеробним условима. За припрему инокулума, узорак ефлуента се филтрира кроз груби филтер, а првих 200 ml се баца. Филтрат се чува у аеробним условима до употребе. Инокулум се употребљава исти дан по узимању узорка секундарног ефлуента. За инокулацију се користи најмање 3 ml ефлуента.

Композитни инокулум

За припрему композитног инокулума користе се три парцијална инокулума:

1) инокулум из секундарног ефлуента;

2) инокулум из земљишта:

– 100 g баштенског земљишта (плодног, не стерилног)суспендује се у 1.000 ml нехлорисане воде за пиће. (Земљиште са изузетно великим уделом глине, песка или хумуса није погодно.) Након мешања, суспензија се остави 30 минута да се исталожи. Супернатант се филтрира кроз груби филтер папир, а првих 200 ml се баца. Филтрат се аерише одмах све до употребе. Инокулум се употребљава исти дан по узорковању;

3) инокулум из површинске воде:

– део за композитни инокулум узима се из мезо-сапробне површинске воде. Узорци се филтрирају кроз груби папир, а првих 200 ml се баца. Филтрат се чува у аеробним условима све до употребе. Инокулум употребити исти дан по узорковању.

Композитни инокулум се узима из мешавине три парцијална инокулума тако што се једнаке запремине сједине и добро промешају. За инокулацију се употребљава најмање 3 ml.

Инокулум активног муља

Узима се највише 3 L активног муља (садржај суспендованих материја до 2,5 g/l) узетог из аерационог базена постројења за обраду доминантно комуналних отпадних вода.

1.6.2. Поступак

Испитивање се изводи на собној температури, која се одржава између 18° C и 25° C.

Испитивање се може извести и на нижим температурама (до 10° C). Ако се супстанца разграђује, не наставља се испитивање. Ако се супстанца не разграђује, испитивање се обавља на сталној температури између 18° C и 25° C.

1.6.2.1. Период стабилизације: образовање муља / стабилизација система

Период раста/стабилизације муља је период у току којег концентрација суспендованих материја активног муља као и рад система достиже стабилно стање у условима дефинисаним овом методом.

Период стабилизације јесте период који траје од тренутка увођења испитиване супстанце у систем до тренутка кад процес уклањања супстанце достигне плато, (релативно константну вредност). Овај период не сме бити дужи од шест седмица.

Период евалуације траје три седмице и то од тренутка кад уклањање испитиване супстанце досегне релативно сталну и најчешће високу вредност. За оне супстанце које се у првих шест седмица слабо или уопште биолошки не разграде, за период евалуације се узимају наредне три седмице.

На почетку се инокулум помешан са инфлуентом уводи у системе потребне за једно испитивање.

Затим се укључује аератор (у случају кад се користи систем OECD потврдног испитивања), а укључи се и пумпа за рециркулацију (E) активног муља) и пумпа за дозирање (B).

Инфлуент без испитиване супстанце пролази кроз аератор (C) брзином 1 литар на сат или 0,5 литара на сат, што омогућава ретенционо време од 3 сата односно 6 сати.

Степен аерације наместити тако да се онемогући таложење садржаја у посуди (C), док је садржај растворeног кисеоника најмање 2 mg/l.

Стварање пене онемогућити одговарајућим средствима, али само уколико не делују ихибиторно на активни муљ.

Муљ који се накупи при врху аератора (C) (у случају система OECD потврдног испитивања при дну сепаратора (D) и у систему за рециркулацију) стругањем или на неки други одговарајући начин вратити у суспензију најмање једном дневно, сваки дан.

Ако се муљ не таложи, повећати његову густину додавањем 2 ml 5% раствора гвожђе-хлорида. Овај поступак се по потреби понавља.

Ефлуент се прикупља у посуди (E или F) у току 20 до 24 сата, а узорак се узима након темељног мешања. Посуду (E или F) пажљиво очистити.

Да би се надгледала и контролисала ефикасност поступка, мере се хемијска потрошња кисеоника (ХПК) или растворени органски угленик (DOC) у филтрату накупљеног ефлуента најмање два пута седмично, као и у филтрату инфлуента (користећи мембране промера 0,45 mm, а првих » 20 ml филтрата се баца).

Кад се успостави приближно уједначена дневна разградња, смањење DOC или ХПК треба да буде уједначено.

Садржај суве материје активног муља (g/l) у аератору одређује се двапут седмично. Системи могу радити на један од два начина:

1) садржај суве материје у активном муљу одређује се двапут седмично, па уколико га има више од 2,5 g/l вишак активног муља се одбацује, или

2) свакодневно се испушта 500 ml испитиване смеше из сваке посуде да се добије средње време ретенције муља од 6 дана.

Када су измерени и процењени параметри два система довољно стабилни (ефикасност уклањања DOC или ХПК, муљ, концентрација, таложење муља, замућеност ефлуента, итд), испитивана супстанца може се додати инфлуенту који улази у један од система, како је описано у одељку 1.6.2.2. ове методе.

Алтернативно, испитивана супстанца се може додати на почетку периода раста муља (видети одељак 1.6.2.1. ове методе), нарочито кад се муљ додаје као инокулум.

1.6.2.2. Процедура испитивања

У периоду стабилизације одржавају се константни услови рада система. Одговарајућа количина раствора испитиване супстанце (око 1%) додаје се у инфлуент који улази у систем, тако да се добије жељена концентрација испитиване супстанце (10 mg до 20 mg DOC/l или 40 mg ХПК/l) у инфлуенту. То се може постићи свакодневним мешањем основног раствора испитиване супстанце са инфлуентом или помоћу секундарне пумпе. Жељена концентрација може се постићи постепено. Уколико испитивана супстанца не испољава токсично дејство на активни муљ, може се тестирати и виша концентрација.

У систему који служи као контрола уводи се само инфлуент без испитиване супстанце. Одговарајуће запремине ефлуента узимају се за анализу и филтрирају кроз мембранске филтере (0,45 mm). Првих (отприлике) 20 ml филтрата се баца.

Филтрирани узорци се анализирају истог дана; у супротном се чувају погодном методом, нпр. коришћењем 0,05 ml 1% раствора живе-хлорида ($HgCl_2$) на сваких 10 ml филтрата или чувањем на температури од 2° C до 4° C, највише 24 сата или на температури нижој од -18°C у току дужег времена.

Период стабилизације, уз додатак испитиване супстанце, не сме трајати дуже од 6 седмица и период евалуације не сме бити краћи од 3 седмице, односно за израчунавање коначног резултата имати око 14 до 20 резултата мерења.

Извођење са спојеним системима

Спојени системи раде тако да једном дневно између два система долази до размене 1,5 L испитиване смеше (укључујући муљ) из аератора за активни муљ. У случају да испитивана супстанца подлеже адсорпцији, узима се 1,5 L течног супернатанта из таложника једног система и пресипа у посуде са активним муљем другог система.

1.6.2.3. Анализа

У циљу праћења својстава супстанце врше се две врсте анализа: DOC и ХПК.

Концентрације DOC одређују се у два понављања помоћу анализатора угљеника, односно вредности ХПК према литератури[2].

Специфична анализа

Концентрације испитиване супстанце одређују се одговарајућим аналитичким поступком. Уколико је могуће, одредити и количину супстанце која се адсорбује на активни муљ.

2. ПОДАЦИ И ПРОЦЕНА

2.1. СПОЈЕНИ СИСТЕМИ

Кад се користе спојени системи, дневни степен уклањања (у даљем тексту: DR) израчунава се на начин описан у одељку 1.2.1. ове методе. DR се формулом (2) коригује на DRc због преноса испитиване супстанце на описани начин за средње време ретенције од 3 сата или формулом (3) за средње време ретенције од 6 сати.

$$DRc = \frac{4}{3}DR - \frac{100}{3} \qquad (2)$$

$$DRc = \frac{8}{7}DR - \frac{100}{7} \qquad (3)$$

Израчунава се средња вредност и стандардне девијације за серију вредности DRc према једначини (4):

$$S_{DRc} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}\left(\overline{DRc} - DRc_i\right)^2}{n-1}} \qquad (4)$$

при чему:

S_{DRc} јесте стандардна девијација за низ DRc вредности;

DRDRc = средња вредност DRc;

n јесте број одређивања.

Екстремне вредности у низу вредности DRc одбацују се одговарајућим статистичким поступком, нпр. Налимовим поступком[6], уз ниво вероватноће од 95%, па се средња вредност и стандардна девијација поново израчунавају за скуп података DRc без екстремних вредности.

Коначан резултат израчунава се према једначини (5):

$$DRc = \overline{DRc} \pm \frac{t_{n-1};\alpha^s}{\sqrt{n}}DRc \qquad (5)$$

при чему:

$t_{n-1};\alpha^s$ јесте табеларна вредност t за n вредност парова E и E_o и статистичка поузданост P (P = 1- a) и тиме је P на 95%[1].

Резултат се изражава као средња вредност са 95% интервалима поверења, стандардним девијацијама и бројем података у скупу података DRc без екстремних вредности, те бројем екстремних података, нпр:

DRc = 98,6 ± 2,3% уклоњеног DOC;

c јесте 4,65% уклоњеног DOC;

n јесте 18;

x јесте број екстремних вредности.

2.2. ОДВОЈЕНИ СИСТЕМИ

Рад система се може проверити помоћу следећег израза:

$$\text{проценат уклањања COD или DOC} = \frac{\text{COD или DOC инфлуента} - \text{COD или DOC ефлуента}}{\text{COD или DOC инфлуента}} \times 100$$

Ове вредности за дневно уклањање DOC или ХПК могу се приказати графички да би се уочило постојање неког тренда, нпр. аклиматизације.

2.2.1. Одређивање ХПК/DOC

Како се израчунава DR дато је у одељку 1.2.1. ове методе.

Израчуна се средња вредност за серије вредности DR.Уз то се рачуна и стандардна девијација према следећем изразу:

$$S_{DR} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}\left(\overline{DR} - DR_i\right)^2}{n-1}} \qquad (6)$$

при чему:

S_{DR} јесте стандардна девијација серије DR_i вредности,

DR јесте средња вредност DR_i вредности,

n јесте број одређивања.

Екстремне вредности у низу вредности DRc се одбацују одговарајућим статистичким поступком, нпр. Налимовим

поступком[6], уз ниво вероватноће од 95%, па се средња вредност и стандардна девијација поново израчунавају за скуп података DRc без екстремних вредности.

Коначан резултат се затим израчуна према формули (7) као:

$$DR = \overline{DR} \pm \frac{t_{n-1;\alpha}}{\sqrt{n}} DR \qquad (7)$$

при чему:

$t_{n-1;\alpha}$ јесте табеларна вредност т за н вредност парова Е и E_o и статистичка поузданост Р (Р = 1– а) чиме је Р постављен на 95%[1].

Резултат се изражава као средња вредност са 95% интервалима поверења, стандардним девијацијама и бројем података у скупу DR без екстремних вредности, те бројем екстремних вредности, нпр:

DR јесте (98,6 ± 2,3)% уклоњеног DOC;

c јесте (4,65)% уклоњеног DOC;

n јесте 18;

x јесте број одступајућих вредности.

2.2.2. Примена специфичне анализе

Како се израчунава проценат уклањања испитиване супстанце из водене фазе (R_w) дато је у одељку 1.2.2. ове методе.

3. ИЗВЕШТАЈ

3.1. ИЗВЕШТАЈ О ИСПИТИВАЊУ

Извештај, ако је могуће, садржи:

– образац дат у Делу четвртом ове методе, са описаним условима у испитивању;

– одабрани систем (OECD потврдно испитивање или „порозна посуда”);

– одабрани начин рада, спојени систем или неки други;

– врсту отпадних вода: синтетичке или комуналне отпадне воде (у случају комуналне отпадне воде навести датум и место узорковања);

– врсту инокулума, са датумом и местом узорковања;

– опис примењеног аналитичког поступка, уколико су се обављале специфичне анализе;

– графички приказ вредности уклањања ХПК или DOC у функцији времена, укључујући период стабилизације и период евалуације;

– ефикасност аналитичке методе за одређивања садржаја испитиване супстанце преко вредности ХПК или DOC за основни раствор испитиване супстанце;

– уколико су рађене специфичне анализе, графички приказ вредности процента уклањања испитиване супстанце из водене фазе у функцији времена (период стабилизације и период евалуације);

– средња вредност и стандардна девијација уклањања DOC или ХПК испитиване супстанце израчунавају се из података за период евалуације, односно кад постоји равномерно уклањање испитиване супстанце или период устаљеног рада јединица система;

– графички приказ концентрације активног муља у функцији времена;

– све напомене у вези са активним муљем (одбацивање сувишка муља, појаве агрегације, $FeCl_3$ итд);

– концентрације испитиване супстанце коришћене у испитивању;

– сви резултати у вези са активним муљем;

– сви подаци и резултати испитивања у вези са испитиваном и референтним супстанцама, ако су коришћене;

– научно оправдани разлози за евентуалне измене поступка испитивања.

3.2. ТУМАЧЕЊЕ РЕЗУЛТАТА

Низак степен уклањања испитиване супстанце из водене фазе може бити последица инхибиторног деловање испитиване супстанце на микроорганизаме активног муља. Ово се, такође, може доказати опажањем лизе ћелија микроорганизама и губитка муља, што даје замућени супернатант, као и смањења ефикасности рада постројења у уклањању ХПК (или DOC).

Понекад може имати утицаја физичко-хемијска адсорпција. Разлике између биолошког деловања на молекул и физичко-

хемијске адсорпције се могу открити анализом муља након одговарајуће десорпције.

Додатна испитивања су потребна уколико се желе разлучити процеси биолошке разградње (или делимичне биолошке разградње) од адсорпције.

То се може урадити на неколико начина, али најбоље је користити супернатант за инокулум у базичном испитивању (најбоље респирометријско испитивање).

Ако се примети висок степен уклањања DOC или ХПК, онда је то последица биоразградње. При нижем степену уклањања, процес биоразградње не може се разликовати од процеса елиминације. На пример, ако једињење растворљиво у води показује висок степен адсорпције од 98%, а дневна стопа потрошње муља већа је за 10%, могућа је елиминација до 40%; при вишку стопе потрошње муља од 30%, елиминација због адсорпције на сувишак муља и уклањања заједно са тим сувишком муља може нарасти и на 65%[4].

Кад се изводе специфичне анализе, обратити пажњу на однос структуре супстанце и врсте анализа које се раде. У овом случају, уочени феномен не може се протумачити као минерализација супстанце.

4. ЛИТЕРАТУРА

1. OECD, Paris, 1981, Test Guideline 303 A, Decision of the Council C(81) 30 final.

2. Annex V C9 Degradation Test – Chemical Oxygen Demand, Commission Directive 84/449/EEC, (OJ L251, 19.9.1984, p. 1).31.5.2008 EN Official Journal of the European Union L 142/553

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., Gerike, P., The fate of soluble, recalcitrant, and adsorbing Compounds in activated sludgeplants, Ecotoxicology and Environmental Safety, vol. 5, No 2, June 1981, p. 161-171.

5. Council Directives 82/242/EEC and 82/243/EEC, (OJ, No L 109, 22.4.1982, p. 1), amending CouncilDirectives 73/404/EEC and 73/405/EEC on biodegradability of detergents, (OJ L 347, 17.12.1973, p.51).

6. Streuli, H., Fehlerhafte Interpretation und Anwendung von Ausreßertests, insbesondere bei Ringversuchenzur Oberprüfung analytisch-chemischer Untersuchungsmethoden, Fresenius-Zeitschrift fürAnalytische Chemie, 303 (1980), p. 406-408.

Део други

A – спремник
B – пумпа за дозирање
C – аератор
D – таложник
E – пумпа за рециркулацију муља
F – колектор
G – дифузер ваздуха
H – мерач протока ваздуха

тврди PVC
материјал:
стакло или
тврди PVC
тврди PVC

Део трећи

Слика 1. Опрема која се користи за процену биоразградљивости

Слика 2. Схема тролитарске порозне посуде за аерацију

Део четврти

УСЛОВИ У ИСПИТИВАЊУ СИМУЛАЦИЈЕ АКТИВНОГ МУЉА

Уписати за сваку групу

Опрема – врста система	
OECD потврдно испитивање	
„порозна посуда"	
Начин извођења испитивања	
појединачни	
спојени системи	
не-спојени системи	
Трансинокулација	
не	
активни муљ	
супернатант	
Средње ретенционо време	
3 сата	
6 сати	
Отпадна вода	
комунална отпадна вода	
синтетичка отпадна вода	
Инокулум	
секундарни ефлуент	
композит	
активни муљ	
Увођење испитиване супстанце	
на почетку испитивања	
постепено увођење	
након стабилизације активног муља	
Анализе	
специфичне анализе	
одређивање ХПК	
одређивање DOC	

C.11. БИОРАЗГРАДЊА – ИСПИТИВАЊЕ ИНХИБИЦИЈЕ РЕСПИРАЦИЈЕ АКТИВНОГ МУЉА

1. МЕТОДА ИСПИТИВАЊА

1.1. УВОД

Овом методом процењује се ефекат испитиване супстанце (при различитим концентрацијама) на микроорганизме мерењем брзине респирације у унапред дефинисаним условима.

Циљ методе је да се омогући брз скрининг тест којим се идентификују супстанце које могу да имају негативан утицај на постројења за аеробно микробиолошко пречишћавање отпадних вода и да се предложе смернице за избор концентрација испитиване супстанце за потребе испитивања биоразградљивости.

Прелиминарна студија може да се ради пре дефинитивног испитивања. Ова студија даје податке о опсегу концентрација које се користе у дефинитивном испитивању.

У поступак испитивања укључене су две контроле без испитиване супстанце: једна која се поставља на почетку и друга на крају, тј. након поставке свих серија концентрација испитиване супстанце. Свака култура активног муља треба да се провери испитивањем са референтном супстанцом.

Метода се најлакше примењује на супстанце које, због своје растворљивости у води и ниске испарљивости, образују стабилне водене растворе.

За супстанце које су слабо растворљиве у медијуму који се користи за потребе овог испитивања није увек могуће

одредити вредност EC_{50}.

Резултати који се заснивају на потрошњи кисеоника могу довести до погрешних закључака у случају кад испитивана супстанца може да заустави оксидативну фосфорилацију.

За извођење испитивања пожељно је имати следеће податке о испитиваној супстанци:

– растворљивост у води;

– напон паре;

– структурна формула;

– степен чистоће испитиване супстанце.

Препорука:Активни муљ може да садржи потенцијално патогене организме, па је при раду са активним муљем потребан опрез.

1.2. ДЕФИНИЦИЈЕ И МЕРНЕ ЈЕДИНИЦЕ

Брзина респирације јесте потрошња кисеоника микроорганизама активног муља, која се изражава као mg O_2 по mg муља по сату.

За израчунавање инхибиторног ефекта испитиване супстанце при одређеној концентрацији, брзина респирације изражава се као проценат средње вредности брзине респирације у две контроле:

$$\left(1-\frac{2R_c}{Rc_1+Rc_2}\right)\times 100 = \%\ \text{инхибиције}$$

при чему:

R_c јесте брзина потрошње кисеоника при датој концентрацији испитиване супстанце;

R_{c1} јесте брзина потрошње кисеоника у контроли 1;

R_{c2} јесте брзина потрошње кисеоника у контроли 2.

У овој методи EC_{50} јесте концентрација испитиване супстанце при којој брзина респирације износи 50% у односу на брзине респирације у контроли под условима дефинисаним за ову методу.

1.3. РЕФЕРЕНТНЕ СУПСТАНЦЕ

Као референтна супстанца препоручује се 3,5-дихлорофенол, супстанца која је позната као инхибитор респирације. За проверу осетљивости одредити EC_{50} вредност за ову супстанцу за сваку културу активног муља.

1.4. ПРИНЦИП МЕТОДЕ

Брзина респирације активног муља помешаног са стандардном количином синтетичке отпадне воде мери се након контакта од 30 минута, три сата или у оба времена. Брзина респирације истог активног муља мери се након излагања различитим концентрацијама испитиване супстанце у идентичним условима. Инхибиторни ефекат испитиване супстанце при одређеној концентрацији изражава се као проценат средње вредности брзине респирације у односу на две контроле. Вредност EC_{50} израчунава се из резултата за серију концентрација испитиване супстанце.

1.5. КРИТЕРИЈУМИ КВАЛИТЕТА

Резултати испитивања су валидни ако:

– вредности брзине респирације у контроли се разликују мање од 15%;

– EC_{50} (30 минута, односно 3 сата) за 3,5-дихлорофенол се налази унутар прихваћеног опсега од 5 до 30 mg/l.

1.6. ОПИС МЕТОДЕ

1.6.1. Реагенси

1.6.1.1. Испитивани раствори

На почетку испитивања припреме се свежи раствори испитиване супстанце из основног раствора. Основни раствор испитиване супстанце од 0,5 g/l је одговарајући уколико се испитивања изводе према упутствима датим у овој методи.

1.6.1.2. Раствор реферетне супстанце

Раствор 3,5-дихлорофенола може се припремити, тако што се, нпр. раствори 0,5 g 3,5-дихлорофенола у 10 ml 1M NaOH, допуни до отприлике 30 ml са дестилиованом водом, дода уз мешање 0,5M H_2SO_4 све док се дође до преципитације – потребно око 8 ml 0,5M H_2SO_4 – и на крају допуни до једног L са дестилованом водом. Вредност pH треба да буде између 7 и 8.

1.6.1.3. Синтетичке отпадне воде

Синтетичка отпадна вода се припрема растварањем следећих количина супстанци у 1 L воде:

– 16 g пептона;

– 11 g месног екстракта;

– 3 g уреe;

– 0,7 g NaCl;

– 0,4 g $CaCl_2$Í$2H_2O$;

– 0,2 g $MgSO_4$Í$7H_2O$;

– 2,8 g K_2HPO_4.

Напомена 1: Ова синтетичка отпадна вода је 100 пута концентрованија од отпадне воде описане у литератури[9], уз додатак дикалијум хидроген фосфата.

Напомена 2*:* Ако се припремљени медијум не користи одмах, чува се у мраку на на температури од 0° C до 4° C, не дуже од једне седмице у условима који обезбеђују његову стабилност. Медијум се пре складиштења може и стерилизовати, или се пептон и месни екстракт могу додати непосредно пре извођења испитивања. Пре употребе, медијум се темељно промеша и прилагоди вредност pH.

1.6.2. Опрема

Апаратура за мерење: прецизна поставка испитивања није од пресудне важности. Треба да постоји довољан слободан простор при врху посуде (headspace) и сонда чврсто да пријања уз врат посуде за мерење.

Потребна је уобичајена лабораторијска опрема, а нарочито:

– апаратура за мерење;

– аератор;

– pH-електрода и опрема за мерење;

– O_2-електрода.

1.6.3. Припрема инокулума

Активни муљ из постројења за обраду доминантно комуналних отпадних вода користи се као микробиолошки инокулум за потребе овог испитивања.

Уколико је потребно, по повратку у лабораторију, грубе честице се могу уклонити краткотрајним таложењем, нпр. 15 минута, а затим се декантује горњи слој са ситнијим честицама и користи се за потребе испитивања. Муљ се може промешати миксером у трајању од неколико секунди.

Постоји сумња да је присутан материјал који делује инхибиторно, те се активни муљ испере водом из чесме или изотоничним раствором. Након центрифугирања, супернатант се декантује (овај поступак се понавља три пута).

Мала количина муља се измери и осуши. Из овог резултата може се израчунати количина влажног муља који је суспендован у води да би се добио активни муљ са концентрацијом чврстих суспендованих материја у опсегу од 2 g/l до 4 g/l. Овај ниво одговара концентрацији између 0,8 g/l и 1,6 g/l у медијуму уколико се испитивање изводи према смерницама.

Ако се муљ не може употребити истог дана, додаје се 50 ml синтетичке отпадне воде у сваки литар активног муља припремљеног на претходно описан начин. Затим се активни муљ аерише преко ноћи на температури од 20° C ± 2° C и аерише се све до испитивања. Пре извођења испитивања, проверава се pH вредност и уколико је потребно, подешава на 6 до 8 pH јединица. Концентрација суспендованих чврстих честица у течној смеши одређује се на начин описан у претходном параграфу.

Уколико се користи иста култура активног муља за испитивања наредних дана (максимално четири дана), додати на 50 ml синтетичке отпадне воде по литру активног муља на крају дана.

1.6.4. Извођење испитивања

Трајање/контактно време: 30 минута, односно 3 сата (непрекидна аерација)

Вода: вода за пиће (дехлорисана по потреби)

Снабдевање ваздухом: чист ваздух без масноћа, доток 0,5 L/min до 1 L/min

Апаратура за мерење: боце са равним дном, попут боца за одређивање БПК

Оксиметар: одговарајућа електрода за кисеоник, са писачем

Раствор нутријената: синтетичка отпадна вода

Испитивана супстанца: свеже припремљен раствор супстанце на почетку испитивања

Референтна супстанца: нпр. 3,5-дихлорофенол (испитују се најмање три концентрације)

Контроле: инокулиран узорак без испитиване супстанце

Температура: 20° C ± 2° C

За испитивање супстанце и референтне супстанце, у трајању од 3 сата, предлаже се следећи поступак:

– користи се неколико посуда (нпр. једнолитарске посуде);

– испитује се најмање пет концентрација испитиване супстанце, у геометријској серији са фактором повећања 3,2;

– у нултом времену (t_0) 16 ml синтентичке отпадне воде раствори се са водом до 300 ml, дода се 200 ml микробиолошког инокулума и добијена смеша (500 ml) се пресипа у прву посуду (прва контрола, K_1);

– посуде се непрекидно аеришу да би се обезбедила концентрација растворeног кисеоника изнад 2,5 mg/l и да би непосредно пре мерења брзине респирације, концентрација растворeног кисеоника била 6,5 mg/l;

– у времену t_{15} (15 минута је арбитрарни, али погодан интервал) понови се описани поступак, с тим да се у 16 ml синтетичке отпадне воде дода 100 ml основног раствора испитиване супстанце, допуни са водом до 300 ml и потом дода микробиолошки инокулум до коначне запремине од 500 ml. Добијена смеша се пресипа у другу посуду и аерише на исти начин. Поступак се понавља сваких 15 минута са различитим запреминама основног раствора испитиване супстанце, како би се добио сет посуда које садрже различите концентрације испитиване супстанце. На крају се припрема друга контрола (K_2);

– након три сата бележи се pH вредност, а добро промешани садржај из прве посуде пресипа се у уређај за мерење брзине респирације у току највише 10 минута;

– мерење се понавља са садржајем сваке посуде у интервалима од 15 минута, како би време контакта у свакој посуди износило 3 сата;

– референтна супстанца се на исти начин испитује на свакој шаржи микробиолошког инокулума;

– примењује се другачији режим (нпр. више од једног оксиметра)у случају да се мерења врше након 30 минута;

– ако се мери хемијска потрошња кисеоника, неопходно је припремити додатне посуде које садрже испитивану супстанцу, синтетичке отпадне воде и обичну воду, али не и активни муљ. Потрошња кисеоника мери се и бележи након аерације, тј. контактног времена.

2. ПОДАЦИ И ПРОЦЕНА

Брзина респирације израчунава се са криве између отприлике 6,5 mg/l O_2 и 2,5 mg/l O_2 или у току десетоминутног периода кад је брзина респирације ниска. Део криве респирације из које се мери брзина респирације да буде линеаран.

Ако се вредности брзина респирације у две контроле разликују за више од 15% или EC_{50} (30 минута, односно три сата) за референтну супстанцу није у оквиру прихваћеног опсега (5 mg/l до 30 mg/l за 3,5-дихлорофенол), испитивање није валидно и потребно га је поновити.

Проценат инхибиције израчунава се за сваку концентрацију испитиване супстанце (видети одељак 1.2. ове методе). Вредности процента инхибиције за сваку концентрацију испитиване супстанце представљају се графички у функцији концентрација на логаритмаском (или лог-пробит) папиру и очитава се EC_{50} вредност.

Интервали поверења од 95% за EC_{50} вредности могу се одредити помоћу стандардних поступака.

3. ИЗВЕШТАЈ

3.1. ИЗВЕШТАЈ О ИСПИТИВАЊУ

Извештај о испитивању садржи податке о:

1) Испитиваној супстанци:

– подаци о хемијској идентификацији;

2) Систему:

– извор;

– концентрација;

– предобрада активног муља (ако је рађена);

3) Условима испитивања:

– pH смеше пре мерења респирације;

– температура;

– трајање испитивања;

– референтна супстанца и израчуната вредност EC_{50};

– абиотичка потрошња кисеоника (уколико постоји);

4) Резултатима:

– сви резултати мерења;

– крива инхибиције и поступак за израчунавање EC_{50};

– EC_{50} и, ако је могуће, 95% интервали поверења, EC_{20} и EC_{80};

– сва опажања и могућа одступања од ове методе испитивања која могу да утичу на резултат.

3.2. ТУМАЧЕЊЕ РЕЗУЛТАТА

EC_{50} вредност се сматра само показатељем потенцијалног негативног деловања испитиване супстанце на процес обраде отпадне воде активним муљем или на микроорганизме из отпадне воде, с обзиром на то да се сложене интеракције које се догађају у животној средини не могу верно симулирати у лабораторијским условима. Резултати испитивања са супстанцом која може имати инхибиторни ефекат на процес оксидације амонијака могу дати атипичне криве инхибиције. Стога се ови резултати и овакве криве тумаче са опрезом.

4. ЛИТЕРАТУРА

1. International Standard ISO 8192-1986.

2. Broecker, B., Zahn, R., Water Research 11,1977, p. 165.

3. Brown, D., Hitz, H. R., Schaefer, L., Chemosphere 10, 1981, p. 245.

4. ETAD (ECOlogical and Tox.icological Association of Dyestuffs Manufacturing Industries), Recommended Method No 103, also described by:

5. Robra, B., Wasserl Abwasser 117, 1976, p. 80.

6. Schefer, W., Textilveredlung 6,1977, p. 247.

7. OECD, Paris, 1981, Test Guideline 209, Decision of the Council C(84) 30 final.

8. OECD, June 11, 1976, Technical Report, 'Proposed method for the determination of the biodegradability of surfactants used in synthetic detergents'.

C.12. БИОРАЗГРАДЊА – МОДИФИКОВАНА SCAS МЕТОДА ИСПИТИВАЊА

1. МЕТОДА ИСПИТИВАЊА

1.1. УВОД

Циљ ове методе је процена могућности потпуне биоразградљивости неиспарљивих, органских материја добро растворљивих у води, ако су изложене релативно високим концентрацијама микроорганизама у току дужег временског периода. Животна активност микроорганизама одржава се у току тог периода свакодневним додавањем талога комуналне отпадне воде за прехрану. (Током викенда, отпадна вода може се чувати на температури од 4° C. Може се користити и синтетичка отпадна вода OECD потврдног испитивања.)

Приликом тумачења резултата узети у обзир могућност физичко-хемијске адсорпције на суспендоване материје (видети одељак 3.2. ове методе).

Због дугог времена задржавања течне фазе (36 сати) и дисконтинуалног додавања нутријената, метода не симулира услове какви постоје у постројењу за пречишћавање отпадних вода. Резултати испитивања са различитим супстанцама показују да ова метода има велики потенцијал биоразградљивости.

Услови у овом испитивању изразито су повољни за избор, односно адаптацију микроорганизама способних да разграде испитивано једињење. (Поступак се може користити и за производњу аклиматизованих инокулума за коришћење у другим испитивањима.)

Помоћу ове методе, потпуна биоразградљивост испитиваних супстанци процењује се на основу измерене концентрације растворeног органског угљеника. DOC је боље одредити након закисељавања и чишћења него га израчунати као разлику Сукупни – Сановрганski.

Истовремено коришћење специфичног аналитичког поступка може да омогући процену примарне биоразградљивости супстанци (нестанак почетне хемијске структуре).

Поступак се може применити само на органске супстанце које су, у концентрацији примењеној у испитивању:

– растворљиве у води (најмање 20 mg/lDOC);

– имају занемарљив напон пара;

– немају инхибиторни ефекат на бактерије;

– не адсорбују се у значајној мери унутар тест система;

– не губе се стварањем пене из тест раствора.

Потребно је утврдити садржај органског угљеника у испитиваном материјалу.

Подаци о релативном уделу главних састојака испитиваног материјала корисни су при тумачењу добијених резултата, посебно у случајевима кад су добијене вредности ниске или граничне.

Подаци о токсичности супстанци за микроорганизме могу бити корисни у тумачењу ниских вредност и избору одговарајуће испитиване концентрације.

1.2. ДЕФИНИЦИЈЕ И ЈЕДИНИЦЕ МЕРЕ

C_T јесте концентрација испитиване супстанце изражена као органски угљеник присутан у или додат талогу отпадне воде на почетку периода аерације (mg/l).

C_t јесте концентрација растворeног органског угљеника у течном супернатанту из испитиване групе на крају периода аерације (mg/l).

C_c јесте концентрација растворeног органског угљеника у течном супернатанту из контроле на крају периода аерације (mg/l).

У овој методи биоразградљивост јесте нестанак органског угљеника. Биоразградљивот се може изразити као:

Проценат разградње оне количине супстанце која се свакодневно додаје – D_{da} (degradation/daily addition) рачуна се према формули:

$$D_{da} = \frac{C_T - (C_t - C_c)}{C_T} \times 100$$

Проценат разградње оне количине супстанце која је присутна на почетку сваког дана –D_{ssd} (degradation/substance start of day) рачуна се према формули:

$$D_{ssd} = \frac{2C_T + C_{ti} - C_{ci} - 3C_{ti(i+1)} + 3C_{ci(i+1)}}{2C_T + C_{ti} - C_{ci}} \times 100 \qquad 2(а)$$

$$\approx \frac{2C_T - 2(C_t - C_c)}{2C_T + (C_t - C_c)} \times 100 \qquad 2(б)$$

Показатељи *i* и (*i* + 1) односе се на дан мерења.

Једначина 2(а) препоручује се ако DOC у излазној води (ефлуенту) варира свакодневно, док се једначина 2(б) може користити кад DOC излазне воде има релативно сталне вредности.

1.3. РЕФЕРЕНТНЕ СУПСТАНЦЕ

Референтне супстанце могу бити од користи када се испитује нова супстанца. За ову методу није препоручена нека одређена референтна супстанца.

Подаци о неколико једињења процењених у међулабораторијском испитивању (ringtest) понуђени су (видети Део други ове методе) у циљу повремене калибрације поступка и да се омогући поређење резултата добијених неким другим поступком.

1.4. НАЧЕЛО МЕТОДЕ ИСПИТИВАЊА

Активни муљ из постројења за обраду отпадних вода ставља се у јединицу за полуконтинуалну обраду активног муља (у даљем тексту: SCAS). Додају се испитивана супстанца и талог комуналне отпадне воде. Ова мешавина се аерише у току 23 сата. Аерација се након тога прекида, мешавина се оставља да се исталожи муљ, а течни супренатант се уклони.

Преостали талог се меша са наредном количином испитиваног једињења и отпадне воде у аерационој комори и поступак се понавља на исти начин.

Биоразградљивост се утврђује одређивањем количине растворeног органског угљеника у течном супернатанту. Ова вредност се пореди са вредношћу измереном у течној фази из контроле, у којој је додат само талог отпадне воде.

Када се користи специфични аналитички поступак, могу се мерити промене у концентрацији изворног молекула изазване биоразградњом (примарна биоразградња).

1.5. КРИТЕРИЈУМИ КВАЛИТЕТА

Поновљивост методе која се базира на уклањању раствореног органског угљеника није утврђена (кад се узме у обзир примарна биоразградљивост, добију се прецизни подаци за материјале који се добро разграђују).

Осетљивост поступка зависи од варијабилности слепе пробе и у мањој мери од прецизности одређивања раствореног органског угљеника и концентрацији тест једињења у течној фази на почетку сваког циклуса.

1.6. ОПИС МЕТОДЕ

1.6.1. Припрема

Потребан је довољан број чистих јединица за аерацију, алтернативно се може користити оригинална SCAS тест јединица запремине 1,5 L и цеви за довод ваздуха (Слика 1) за сваку тест супстанцу и контроле. Компримовани ваздух прочишћен кроз вату који се доводи у тест јединице не сме да садржи органски угљеник и претходно да буде засићен водом да се смање губици испаравањем.

Узорак течне мешавине, која садржи од 1 g до 4 g суспендованих материја по литру, добија се из постројења за обраду активног муља које обрађује претежно комунални отпадну воду. За сваку аерациону јединицу потребно је око 150 mg течне мешавине.

Основни раствори испитиване супстанце припремају се у дестилованој води. Најчешће је потребна концентрација од 400 mg/l као органски угљеник, што даје концентрацију испитиване супстанце од 20 mg/l угљеника на почетку сваког циклуса аерације, ако не долази до биолошке разградње.

Могу се користити и више концентрације ако не узрокују токсичан ефекат на микроорганизме.

У основном раствору мери се садржај органског угљеника.

1.6.2. Услови испитивања

Испитивање се изводи на температури од 20° C до 25° C.

Користи се висока концентрација аеробних микроорганизама (највише 1 g/l до 4 g/l суспендованих материја), а делотворан период задржавања је 36 сати. Материјал који садржи угљеник у највећој мери се оксидује у хранљивој подлози од отпадних вода, обично унутар осам сати након почетка сваког циклуса аерације. Након тога, муљ дише ендогено за време преосталог периода аерације, у току којег је испитивано једињење једини расположиви супстрат, осим у случају да се и оно брзо разграђује. Ова својства, у комбинацији са дневном реинокулацијом кад се као подлога користи комунална отпадна вода, обезбеђују повољне услове за аклиматизацију и за високи степен биолошке разградње.

1.6.3. Поступак

Узима се узорак течне мешавине из уређаја лабораторијског типа или погодног постројења за обраду активног муља из претежно комуналне отпадне воде и чува у аеробним условима до коришћења у лабораторији. Свака аерациона јединица као и контролна јединица пуне се са по 150 mg течне мешавине (ако се користи оригинална SCAS тест јединица, та се запремина множи са 10) и започиње се са аерацијом. Након 23 сата, аерација се прекида и муљ се оставља 45 минута да се исталожи. Наизменично се отварају славине сваке посуде и извлачи се по 100 mg течног супернатанта. Узорак исталожене комуналне отпадне воде узима се непосредно пре употребе, а 100 mg се додаје муљу који је преостао у свакој аерационој јединици. Поново се започиње са аерацијом. У овој фази не додаје се испитивани материјал, а у јединице се свакодневно додаје комунална отпадна вода све док се након таложења не добије супернатант у облику бистре течности. За то је обично потребно две недеље, а до краја тог периода растворени органски угљеник у течном супернатанту на крају сваког аерационог циклуса приближава се константној вредности.

На крају овог периода, поједини исталожени муљеви се помешају и у сваку јединицу се дода по 50 mg овако припремљеног композита.

У контролне јединице додаје се по 95 mg исталожене отпадне воде и 5 mg воде, а у испитиване јединице 95 mg исталожене отпадне воде и 5 mg одговарајућег основног раствора испитиваног једињења (400 mg/l). Поново се започиње са аерацијом која траје 23 сата. Муљ се затим остави 45 минута да се слегне, извуче се супернатант и анализира се садржај растворeног органског угљеника.

Описани поступак понавља се свакодневно у току трајања испитивања.

Пре таложења, потребно је очистити честице које су се накупиле на зидовима јединица изнад нивоа течности. За чишћење сваке јединице користити посебну стругалицу или четку да се спречи међусобна контаминација.

У идеалном случају, растворени органски угљеник у течном супернатанту одређује се сваког дана, али анализе могу бити и ређе. Течности се пре анализе филтрирају кроз испране мембранске филтере од 0,45 µm или се центрифугирају. Одговарајући мембрански филтери су они који не отпуштају угљеник нити апсорбују супстанце у току филтрације. Температура узорка за време центрифугирања не сме бити већа од 40° C.

Дужина испитивања за једињења која се слабо или уопште биолошки не разграђују није одређена, али на основу искуства, треба да буде најмање 12, а највише 26 недеља.

2. ПОДАЦИ И ПРОЦЕНА

Вредности растворeног органског угљеника у течном супернатанту испитиваних и контролних јединица графички се приказују у функцији времена.

Кад се постигне биолошка разградња, ниво те разградње у испитиваним јединицама приближава се нивоу разградње у контролним јединицама. Кад се разлика између два нивоа у три узастопна мерења устали, број даљих мерења треба да буде довољан да омогући статистичку обраду података и израчунавање процената биолошке разградње (D_{da} или D_{ssd}, видети одељак 1.2. ове методе).

3. ИЗВЕШТАЈ

3.1. ИЗВЕШТАЈ О ИСПИТИВАЊУ

Извештај о испитивању, ако је могуће, садржи:

– све податке о врсти отпадне воде, типу употребљене јединице и резултатима који се тичу испитиване супстанце, референтне супстанце – ако је коришћена, и слепе пробе;

– температуру;

– криву уклањања са описом, начин израчунавања (видети одељак 1.2. ове методе);

– датум и место где су узети узорци активног муља и отпадне воде, статус адаптације, концентрација, итд;

– научно утемељене разлоге за могуће измене испитивања поступка;

– потпис и датум.

3.2. ТУМАЧЕЊЕ РЕЗУЛТАТА

Супстанца која се испитује овом методом није биолошки лако разградљива, те се до уклањања DOC изазваног једино биолошком разградњом долази постепено у току више дана или недеља, осим у случају кад нагло наступи аклиматизација на шта указује нагли нестанак након неколико недеља.

Физичко-хемијска адсорпција је некада важна, што се види из потпуног или делимичног уклањања додатог DOC на почетку испитивања. Оно што се догоди након тога зависи од фактора као што је степен адсорпције и концентрација суспендованих материја у одбаченом ефлуенту. Обично се почетно ниска разлика између концентрације DOC у контролним и испитиваним течним супернатантима поступно повећава и затим се задржава на новој вредности до краја испитивања, осим у случају аклиматизације.

Ако се биоразградљивост (или делимична биоразградљивост) жели разликовати од адсорпције, потребно је спровести додатна испитивања. Најбоље је за ово користити течни супернатант или муљ као инокулум у основном експерименту (најбоље је урадити респирометријско испитивање).

Кад се у овом испитивању добије висок степен уклањања DOC без адсорпције, испитивана супстанца се сматра потенцијално биоразградљивом. Делимично неадсорптивно уклањање указује на делимичну биоразградљивост испитиване супстанце.

Ако је уклањање DOC ниско или до њега не долази, узрок може бити инхибиторно дејство испитиване супстанце на микроорганизаме. То се може открити лизом и губитком муља, што даје замућен супернатант. Испитивање поновити помоћу нижих концентрација испитиване супстанце.

Употреба посебног аналитичког поступка или испитиване супстанце обележене изотопом угљеника C^{14} може повећати осетљивост.

Ако се користе испитивана једињења означена са C^{14}, проналазак C^{14} потврђује да је дошло до биоразградње.

Кад се резултати приказују на основу примарне биоразградње, дати објашњење о промени хемијске структуре која доводи до губитка одговора изворне испитиване супстанце.

Валидација аналитичког поступка даје се заједно са одговором добијеним на испитној подлози која је служила као слепа проба.

4. ЛИТЕРАТУРА

1. OECD, Paris, 1981, Test Guideline 302 A, Decision of the Council C(81) 30 final.

Део други
SCAS метода испитивања: пример резултата

Супстанца	CT (mg/l)	C_t-C_c (mg/l)	Проценат биоразградње – D_{da}	Дужина испитивања (број дана)
4-ацетил аминобензен сулфонат	17,2	2,0	85	40
тетрапропилен бензен сулфонат	17,3	8,4	51,4	40
4-нитрофенол	16,9	0,8	95,3	40
Диетилен гликол	16,5	0,2	98,8	40

анилин	16,9	1,7	95,9	40
циклопентан тетракарбоксилат	17,9	3,2	81,1	120

Део трећи
Пример опреме за испитивање

C.13. БИОКОНЦЕНТРАЦИЈА: ИСПИТИВАЊЕ НА РИБАМА У ПРОТОЧНОМ СИСТЕМУ

Део први

1. МЕТОДА ИСПИТИВАЊА

Метода се заснива на Упутству за испитивање OECD 305 (1996).

1.1. УВОД

Овом методом испитивања одређује се потенцијал биоконцентрације испитиване супстанце у рибама када се оне држе у проточном систему. Иако је проточни систем најпогоднији, испитивање се може извести и у полустатичном систему под условом да су задовољени критеријуми квалитета.

У методи су дате прецизне инструкције за извођење испитивања, али се дозвољавају модификације поступка испитивања у зависности од лабораторијских услова, односно својстава испитиване супстанци. Метода је намењена за испитивање стабилних органских супстанци са вредностима log P_{ow} између 1,5 и 6,0[1], али се могу испитивати и суперлипофилне супстанце (које имају вредност log P_{ow} > 6,0). Прелиминарна процена фактора биоконцентрације (bioconcentration factor, у даљем тексту: BCF), који се понекад означава са K_B, за такве суперлипофилне супстанце је већа од вредности фактора биоконцентрације у равнотежном до којих се долази извођењем лабораторијских испитивања. Прелиминарне процене стању (steady-state bioconcentration factor, у даљем тексту: BCF_{SS}) фактора биоконцентрације за органске супстанце са високим вредностима log P_{ow} чак до 9,0 могу се добити помоћу једначине[2]. Параметри који одређују биоконцентрациони потенцијал укључују константу брзине уноса (k_1), константу брзине елиминације (k_2) и фактор биоконцентрације у равнотежном стању BCF_{SS}.

Испитивање са обележеним испитиваним супстанцама може олакшати анализу узорака воде и узорака ткива рибе, али може и помоћи у планирању следећих корака – да ли је потребно идентификовати и квантификовати продукте разградње. Уколико се мере укупни радиоактивни резидијуми (нпр. сагоревањем или растварањем ткива), BCF се односи на полазну супстанцу, преостале метаболите, као и асимилирани угљеник. Фактори биоконцентрације који се базирају на укупним радиоактивним резидијумима не могу се директно поредити са факторима биоконцентрације који су добијени специфичним хемијским анализама само за полазну супстанцу.

Поступци чишћења могу се искористити у испитивањима са радиообележеним супстанцама да би се одредила вредност BCF за полазну супстанцу, а по потреби се могу окарактерисати и главни метаболити. Могуће је комбиновати студије проучавања метаболизма риба и испитивања биоконцентрације путем анализе и идентификације резидиума у ткивима.

1.2. ДЕФИНИЦИЈЕ И ЈЕДИНИЦЕ МЕРЕ

Биоконцентрација/биоакумулација јесте повећање концентрације испитиване супстанце у или на организму (или

одређеним ткивима) у односу на концентрацију испитиване супстанце у одговарајућем медијуму.

Фактор биоконцентрације (BCF или K_B) јесте однос концентрације испитиване супстанце у или на риби, или одређеним ткивима рибе (C_fсе изражава у mg/g (ppm))и концентрације те супстанце у окружујућем медијуму (C_wсе изражава у µg/ml (ppm)),у било ком тренутку фазе уноса током испитивања акумулације супстанце.

Фактор биоконцентрације у равнотежном стању (BCF_{SS} или K_B) се не мења значајно у току дужег временског периода. Концентрација испитиване супстанце у медијуму у току овог периода је стална.

Плато или равнотежно стање се уочава код графичког приказа концентрације испитиване супстанце у риби (C_f) у фунцкији времена као равна линија паралелна са x-осом. Равнотежним стањем се сматра када се резултати три узастопна мерења концентрације испитиване супстанце C_f у узорцима узетим у интервалима од најмање два дана међусобно разликују до ± 20% и кад не постоје значајне разлике између три периода узорковања. Кад се анализирају здружени узорци потребно је урадити најмање четири узастопне анализе. За испитиване супстанце које споро усвајају, погоднији су интервали од седам дана.

Фактор биоконцентрације који се израчунава директно преко вредности константи брзине уноса и елиминације (k_1/k_2) јесте кинетички фактор биоконцентрације (у даљем тексту: BCF_K).

Коефицијент расподеле у систему *n*-октанол/вода (P_{ow}) јесте однос вредности за растворљивост хемијске супстанце у *n*-октанолу и вредности за растворљивост у води у равнотежном стању (Метода А.8. која је дата у овом правилнику). Логаритам од P_{ow} користи се као индикатор биоконцентрационог потецијала хемијске супстанце у акватичним организмима.

Фаза изложености или уноса јесте време у току којег је риба изложена испитиваној супстанци.

Константа брзине уноса (k_1) јесте нумеричка вредност којом се дефинише степен пораста концентрације испитиване супстанце у/на риби (или одређеним ткивима рибе) кад је риба изложена датој супстанци (k_1 се изражава у дан$^{-1}$).

Фаза пост-изложености или фаза елиминације јесте период у коме долази до смањења (или потпуне елиминације) испитиване супстанце из јединки (рибе) (или одређеног ткива те рибе), а наступа након премештања јединки из медијума у чист медијум (тј. медијум који не садржи испитивану супстанцу).

Константа брзине елиминације (k_2) јесте нумаричка вредност којом се дефинише степен смањења концентрације испитиване супстанце у јединци (риба) (или одређеним ткивима те рибе) након трансфера јединки из медијума у чист медијум (k_2 се изражава као дан$^{-1}$).

1.3. ПРИНЦИП МЕТОДЕ ИСПИТИВАЊА

Испитивање се састоји из две фазе: фазе изложености (уноса) и фазе пост-изложености (елиминације). Током фазе уноса, појединачне групе риба исте врсте изложене су испитиваној супстанци у најмање две концентрације. Рибе се затим преносе у чист медијум и наступа фаза елиминације. Фаза елиминације је неопходна, осим уколико је унос испитиване супстанце у току фазе уноса био незнатан (нпр. BCF мањи од 10). Концентрација испитиване супстанце у или на риби (или одређеним ткивима рибе) се прати у току обе фазе испитивања. Уз две концентрације испитиване супстанце (две испитиване групе), поставља се и контрола са јединкама риба у условима идентичним онима у испитиваним групама, осим што код контроле јединке нису изложене испитиваној супстанци. На тај начин се уочени негативни ефекти у испитиваним групама могу приписати искључиво деловању испитиване супстанце.

Фаза уноса траје 28 дана, осим у случају кад се равнотежно стање успостави раније. Трајање фазе уноса и време до постизања равнотежног стања може се предвидети помоћу једначине из Дела трећег ове методе. Након тога започиње фаза елиминације: јединке риба се премештају у други чисти акваријум са истим медијумом, али без испитиване супстанце. Кад је могуће, BCF израчунати и као BCF_{SS}, тј. као однос концентрације супстанце у риби (C_f) и њене концентрације у води (C_w) при уоченом равнотежном стању и као BCF_K, тј. однос вредности константи брзине уноса (k_1) и елиминације (k_2), уколико се процес може описати као кинетика првог реда. Уколико се процес не може описати као кинетика првог реда, употребити сложеније моделе (видети Део шести ове методе).

Ако се равнотежно стање не постигне у року од 28 дана, фаза уноса се продужава до тренутка успостављања равнотеже или највише до 60 дана, када се започиње са фазом елиминације.

Вредности за константу брзине уноса, константу брзине елиминације (губитка) (или више константи, кад су укључени сложенији модели), фактор биоконцентрације и где је то могуће, интервали поверења за сваки од ових параметара израчунавају се из модела који најбоље описује измерене концентрације испитиване супстанце у риби и води.

BCF се изражава у функцији укупне свеже тежине рибе. У посебним случајевима могу се користити одређена ткива или органи (нпр. мишићи, јетра) ако је риба довољно велика или се може поделити у јестиве (филети) и нејестиве делове (унутрашњи органи). За многе органске супстанце постоји јасна веза између биоконцентрационог потенцијала и липофилности, те постоји и одговарајући однос између садржаја липида у јединкама рибе и уочене биоконцентрације тих супстанци. Да се смањи овај извор варијабилности резултата испитивања за супстанце са израженом липофилношћу (односно са log P_{ow}> 3), биоконцентрацију изразити у односу на укупну тежину јединке и у односу на садржај липида у организму.

Кад је могуће, садржај липида одредити на истом биолошком материјалу у којем се мери концентрација испитиване супстанце.

1.4. ПОДАЦИ О ИСПИТИВАНОЈ СУПСТАНЦИ

Пре извођења испитивања биоконцентрације, имати следеће податке о испитиваној супстанци:

– растворљивост у води;

– коефицијент расподеле у систему *n*-октанол/вода, P_{ow} (означава се и са K_{ow}, одређује се HPLC методом описаном у Методи А.8);

– хидролиза;

– фототрансформација у води под природним или вештачким осветљењем и у условима осветљења који су дефинисани овом методом[3];

– површински напон (односно за супстанце где се log P_{ow} не може одредити);

– напон паре;

– брза биолошка разградљивост (ако је одговарајуће).

Остали потребни подаци укључују токсичност испитиване супстанце за изабрану врсту рибе која се користи у испитивању, ако је могуће асимптотска LC_{50} (односно независна од времена). На располагању имати одговарајућу аналитичку методу познате тачности, прецизности и осетљивости за квантификацију испитиване супстанце у растворима и у биолошком материјалу, као и податке о припреми и чувању узорка. Потребно је да буде познат лимит детекције испитиване супстанце како у води, тако и у рибљим ткивима. Ако се користи испитивана супстанца обележена са изотопом угљеника C^{14}, знати и проценат радиоактивности који се приписује нечистоћама.

1.5. ВАЛИДНОСТ ИСПИТИВАЊА

Да би се испитивање сматрало валидним потребно је да буду испуњени услови:

– варирање температуре мање од ± 2° C;

– сатурација кисеоника већа од 60%;

– концентрација испитиване супстанце у посудама (акваријумима) одржава се унутар ± 20% средње вредности измерене у току фазе уноса;

– смртност или други штетни ефекти/болести уочени код јединки у контроли и испитиваним групама да буде мања од 10% на крају испитивања. Кад је испитивање продужено на неколико седмица или месеци, смртност или други штетни ефекти у контроли и испитиваним групама треба да буду мањи од 5% месечно и да не премашују укупно 30% у току трајања целог испитивања.

1.6. РЕФЕРЕНТНЕ СУПСТАНЦЕ

Испитивање референтних супстанци за које се располаже подацима о биоконцентрационом потенцијалу може бити корисно за проверу процедуре испитивања. Нису препоручене одређене референтне супстанце.

1.7. ОПИС МЕТОДЕ

1.7.1. Опрема

Сваки део опреме је направљен од инертног материјала који не утиче штетно на јединке које се користе у испитивању. Могу се користити стандардни правоугаони или цилиндрични акваријуми, направљени од хемијски интерног материјала и одговарајуће запремине који одговара динамици насада. Употребу меких пластичних цеви свести на најмању могућу меру. Предност се даје тефлону, нерђајућем челику, односно стакленим цевима. Искуство је показало да за супстанце са високим коефицијентима адсорпције, као што су синтетички пиретроиди, користити силанизирано стакло. Опрема се, у овом случају, након употребе баца.

1.7.2. Вода

Уобичајено се користи обична вода, која се добија из неконтаминираног извора са уједначеним квалитетом. Квалитет воде за разблаживање је такав да за време трајања периода аклиматизације и периода испитивања омогући преживљавање одабране врсте риба и да не изазива негативне промене у изгледу и понашању јединки. У идеалном случају, показује се да изабрана врста рибе може да преживи, расте и размножава се у води за разблаживање (нпр. у лабораторијској култури или у току испитивања токсичности). У опису квалитета воде навести pH вредност, тврдоћу, укупне суспендоване материје, укупан органски угљеник. Пожељно је навести и садржај амонијака, нитрита и алкалитет, а за морске врсте и салинитет. Параметри потребни за оптималан раст и развој риба потпуно су познати и у Делу другом ове методе дате су препоручене максималне концентрације сета параметара за слатку и морску воду која се користи у испитивању.

Током трајања испитивања, вода је уједначеног квалитета. Вредност pH је између 6,0 и 8,5 и у току испитивања се одржава унутар опсега од ± 0,5. Да би се осигурало да вода за разблаживање неће утицати на резултате испитивања (нпр. комплексирањем испитиване супстанце) или да неће штетно утицати на јединке одабране врсте риба, потребно је периодично узимати узорке воде за анализу. Мере се концентрације тешких метала (нпр. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), главних анјона и катјона (нпр. Cu, Mg, Na, K, Cl, SO_4), пестицида (нпр. укупне органофосфорне и укупне органохлорне пестициде), укупног органског угљеника и суспендваних материја, нпр. на свака три месеца ако се зна да је вода за разблаживање релативно уједначеног квалитета. Ако се утврди да је квалитет воде уједначен у току најмање годину дана, провера квалитета може бити ређа, а интервали дужи (нпр. сваких 6 месеци).

Садржај природних материја као и укупни органски угљеник (у даљем тексту: TOC) у води за разблаживање треба да буде што мањи да би се избегла адсорпција испитиване супстанце на органску материју што може смањити биодоступност супстанце[4]. Максимална прихватљива вредност за суспендоване материје је 5 mg/l (суве материје, не пролази филтер од 0,45 mm) и за укупни органски угљеник 2 mg/l (видети Део други ове методе). Вода се, по потреби, филтрира пре употребе. Екскрети јединки, као и остаци хране доприносе укупном садржају органског угљеника, па их свести на минималну меру. Током читавог периода испитивања, концентрација органског угљеника у акваријуму не треба да буде већа од концентрације органског угљеника која потиче од испитиване супстанце. Концентрација растварача, уколико се користи у испитивању, не сме да буде већа од 10 mg/l (± 20%).

1.7.3. Испитивани раствори

Основни раствор испитиване супстанце припрема се у одговарајућој концентрацији. Основни раствор се припрема мешањем или мућкањем испитиване супстанце у води за разблаживање. Не препоручује се употреба растварача или дисперзионих средстава. Некада је неопходна употреба ових средстава ради добијања основних раствора испитиване супстанце жељене концентрације. Растварачи који се могу користити су етанол, метанол, етиленгликол монометил етер, етиленгликол диметил етер, диметилформамид и триетилен гликол. Дисперзиона средства која се могу користити су Cremophor RH40, Tween 80, метилцелулоза 0,01% и HCO-40. Мере опреза узети у обзир кад се користе брзо биолошки разградљива дисперзиона средства, јер могу проузроковати проблеме са растом бактерија у испитивању у проточним условима. Испитивана супстанца може се означити радиоактивним изотопом и треба да буде највишег степена чистоће (ако је могуће > 98%).

За испитивање у проточним условима потребан је систем са диспензором и дилутером раствора испитиване супстанце (нпр. пумпа са мерачем, систем за пропорционално разблаживање, систем за засићење) да би се у акваријумима одржавала константна концентрација те супстанце. Пожељно је да се најмање пет пута у току дана измени целокупна запремина акваријума. Предност се даје испитивању у проточним условима, али у случајевима где то није могуће (нпр. кад постоје штетни ефекти на организме које се користе у испитивању) може се изводити и испитивање у семи-статичким условима, ако су задовољени критеријуми валидности. Проток основног раствора испитиване супстанце и воде за разблаживање проверава се 48 сати пре почетка и затим најмање једанпут дневно у току испитивања. Ова провера укључује одређивање протока у сваком акваријуму и проток не сме да варира више од 20% у једном акваријуму, као и између акваријума.

1.7.4. Избор врста за потребе испитивања

Критеријуми за избор врсте риба су да су лако доступне, да се могу добити у одговарајућим величинама и да се могу на задовољавајући начин узгајати у лабораторији. Други критеријуми за избор врсте укључују њену комерцијалну, рекреациону и еколошку важност, као и могућност поређења осетљивости са другим врстама, претходну успешну употребу у испитивањима, итд.

Препоручене врсте за потребе ове методе наведене су Делу другом ове методе. Могу се користити и друге врсте, али у том случају модификовати методу испитивања како би се обезбедили погодни услови. У извештају се даје објашњење за избор врсте и методе испитивања.

1.7.5. Гајење риба

Аклиматизација матичног јата риба траје најмање две седмице у води при температурном режиму и режиму исхране дефинисаним за само испитивање.

Након периода аклиматизације од 48 сати, уочава се смртност и примењују следећи критеријуми:

– ако је смртност већа од 10% популације у седам дана, цело матично јато се одбацује;

– ако је смртност између 5% и 10% популације у седам дана, матично јато се аклиматизује још седам дана;

– ако је смртност мања од 5% популације у седам дана, матично јато се прихвата;

– ако је смртност изнад 5% у наредних 5 дана, цело јато се одбацује.

Треба водити рачуна да јединке рибе које се користе у испитивању немају видљивих болести и абнормалности. Свака оболела јединка искључује се из испитивања. Јединке се не смеју лечити две седмице пре почетка испитивања, као нити за време самог испитивања.

1.8. ИЗВОЂЕЊЕ ИСПИТИВАЊА

1.8.1. Прелиминарно испитивање

Пожељно је извести прелиминарно испитивање како би се поставили оптимални услови за коначно испитивање, нпр. избор испитиваних концентрација супстанце, трајање фаза уноса и елиминације.

1.8.2. Услови изложености

1.8.2.1. Трајање фазе уноса

Трајања фазе уноса може се предвидети на основу искуства (нпр. из претходног испитивања, или резултата испитивања са супстанцом сличног потенцијала за акумулацију) или одређених емпиријских односа на основу познавања или растворљивости у води или коефицијента расподеле у систему *п*-октанол/вода за испитивану супстанцу (видети Део четврти ове методе).

Фаза уноса траје 28 дана, осим у случају кад се може уочити да се равнотежно стање успоставило и раније. Ако се

равнотежно стање не достигне до краја 28. дана, фазу уноса продужити до достизања равнотежног стања или до 60 дана, зависно од тога који услов се пре испуни.

1.8.2.2. Трајање фазе елиминације

Половина времена колико траје фаза уноса јесте довољно дуг период да наступи задовољавајуће смањење садржаја испитиване супстанце у организму јединке од нпр. 95% (за објашњење процене видети Део четврти ове методе). Ако је време да се постигне 95% смањења непрактично дуго и премашује нпр. двоструку дужину трајања нормалног трајања фазе уноса (тј. више од 56 дана) може се користити краћи период (односно док концентрација испитиване супстанце не достигне вредност мање од 10% равнотежне концентрације). За одређивање константи брзине елиминације супстанци код којих су процеси уноса и елиминације сложенији и не представљају кинетику првог реда, продужити трајање фазе елиминације. Тај период може бити одређен временом у току којег концентрација испитиване супстанце у риби остаје изнад лимита детекције.

1.8.2.3. Број јединки риба

Број јединки риба за сваку испитивану концентрацију треба да буде довољан да обезбеди најмање четири јединке рибе по узорковању. За прецизнија статистичка одређивања, потребно је имати на располагању већи број јединки риба.

Уколико се у испитивању користе одрасле јединке риба, у извештају навести да ли се ради о мужјаку или женки или се користе јединке оба пола. Ако се користе јединке оба пола, потврдити да разлике у садржају липида између мужјака и женки пре почетка излагања испитиваној супстанци нису значајне. Може бити неопходно да се обједине узорци за све јединке мушког и за све јединке женског пола.

За свако испитивање бирају се јединке приближно исте тежине, тако да тежина најмањих примерака није мања од две трећине тежине највећих примерака. Све јединке треба да буду истог узраста и да потичу из истог матичног јата. Примећено је да тежина и узраст јединки риба имају значајан утицај на вредност BCF[1], па се ови подаци наводе у извештају. Препоручује се да се пре испитивања из матичног јата узме неколико јединки риба и измери њихова тежина како би се проценила средња тежина јединки матичног јата.

1.8.2.4. Насад

Велика количина воде у односу на тежину јединки риба користи се како би се смањила редукција вредности C_w проузрокована додавањем јединки рибе на почетку испитивања и да би се избегло смањење концентрације раствореног кисеоника. Важно је да режим насада јединки рибе одговара врсти рибе која се користи у испитивању. Препоручује се режим насада од 0,1 g до 1,0 g рибе (свеже масе) по литру воде на дан. Повећан унос се користи ако се покаже да се тражена концентрација испитиване супстанце може одржати унутар граница од ± 20% и да сатурација кисеоника не пада испод 60%.

У избору одговарајућег режима уноса, узима се у обзир природно станиште дате врсте риба. На пример, риба која живи при дну може за исту запремину воде захтевати већу површину дна у акваријуму у односу на пелагијске врсте.

1.8.2.5. Исхрана

Током периода аклиматизације и периода трајања испитивања, рибе се хране одговарајућом храном познатог садржаја липида и укупних беланчевина, у количини довољној да их одржи здравима и са сталном телесном тежином. Рибе се хране сваки дан у току читавог периода аклиматизације и у току трајања испитивања у количини од приближно 1% до 2% телесне тежине дневно. Овакав режим одржава садржај липида код већине рибљих врста на релативно уједначеном нивоу у току испитивања. Количина хране се прерачунава, нпр. једном седмично, како би се одржала уједначена телесна тежина и уједначен садржај липида. За овај прерачун, тежина јединки у сваком акваријуму одређује се на основу тежине јединки рибе које су претходни пут узете за узорковање из тог акваријума. Не мери се тежина преосталих јединки у акваријуму.

Храна која није поједена и екскременти свакодневно се испуштају из акваријума након храњења (30 минута до 1 сат). Акваријуми се одржавају чистим, у што већој могућој мери, у току читавог трајања испитивања, тако да се концентрација органске материје одржава на што нижем нивоу, с обзиром на то да присуство органског угљеника може ограничити биодоступност испитиване супстанце[1].

Многе врсте рибље хране направљене су од рибљих прерађевина, те анализирати садржај те хране на присуство испитиване супстанце. Било би добро анализирати пестициде и тешке метале у храни.

1.8.2.6. Светлост и температура

Фотопериод уобичајено траје 12 до 16 сати, а температура (± 2° C) треба да одговара врсти риба која се користи у испитивању (видети Део трећи ове методе). Врста и својства осветљења треба да буду познати. Потребан је опрез због могуће трансформације испитиване супстанце под утицајем светлости при датим условима осветљења дефинисаним за ову методу. Користи се одговарајуће осветљење и избегава излагање рибе вештачком светлу. У неким случајевима пожељно је користити одговарајући филтер за блокирање UV зрачења таласне дужине испод 290 nm.

1.8.2.7. Концентрације испитиване супстанце

Испитивање се одвија у проточном систему и испитују се најмање две концентрације испитиване супстанце. Виша или највиша концентрација испитиване супстанце обично је 1% акутне асимптотске вредности LC_{50} те супстанце и потребно је да буде најмање десет пута виша од лимита детекције примењеног аналитичког поступка.

Највиша испитивана концентрација супстанце може да се одреди дељењем 96 h LC_{50} вредности за акутну токсичност са одговарајућом ACR[VIII] вредношћу (ACR неких хемикалија се креће у распону од 3 до 100). Уколико је могуће, у испитивању се користи једна или више других концентрација које се од највише испитиване концентрације разликују за фактор 10. Ако

то није могуће, због критеријума од 1% LC_{50} и лимита детекције аналитичке методе, може да се употреби мањи фактор или се разматра испитивање супстанце која је обележена радиоактивним изотопом угљеника – C^{14}. Ниједна концентрација не треба да буде једнака максималној растворљивости испитиване супстанце.

Када се користи растварач, његова концентрација не треба да буде већа од 0,1 ml/l и треба да буде иста у свим третманима. Растварач заједно са испитиваном супстанцом доприноси укупном садржају органског угљеника у медијуму и треба да буде познат његов удео у укупном садржају органског угљеника. Употребу растварача треба свести на најмању могућу меру.

_____

VIII Однос акутне и хроничне токсичности(acute/chronic toxicity ratio) је факторкоји служи за процену хроничне токсичности неке хемикалије на основу података о њеној акутној токсичности и обрнуто.

1.8.2.8. Контроле

У испитивању је потребно имати једну контролну групу са јединкама рибе само у чистом медијуму или, уколико је релевантно, додатну контролну групу са растварачем, по условом да је претходно утврђено да дати растварач не испољава ефекат на јединке. У супротном, постављају се обе контролне групе.

1.8.3. Учесталост мерења квалитета воде

Током испитивања у свим акваријумима мерити: растворени кисеоник, TOC, pH вредност и температури акваријумима. Укупна тврдоћа и салинитет, уколико су релевантни, мере се у контролама и у једном акваријуму са вишом (или највишом) концентрацијом. Растворени кисеоник и салинитет, уколико је релевантно, мере се најмање три пута: на почетку, око средине и на крају фазе уноса и једном седмично у току фазе елиминације. TOC се мери на почетку испитивања (24 сата и 48 сати пре почетка фазе уноса) пре уноса рибе и најмање једанпут седмично у току фаза уноса и елиминације. Температура се мери свакодневно. Вредност pH се мери на почетку и на крају сваке фазе, а тврдоћа једанпут у току испитивања. Пожељно је непрекидно мерити температуру најмање у једном акваријуму.

1.8.4. Узорковање и анализирање рибе и воде

1.8.4.1. Распоред узорковања рибе и воде

Узорак воде из комора за испитивање, ради одређивања концентрације испитиване супстанце, узима се пре уноса рибе и у току фаза уноса и елиминације. Вода се узима кад и риба и то пре њеног храњења. Током фазе уноса, мере се концентрације испитиване супстанце да би се потврдило да су задовољени критеријуми квалитета.

Јединке риба узоркују се најмање пет пута у току фазе уноса и најмање четири пута у току фазе елиминације. У неким случајевима је тешко израчунати довољно прецизну процену BCF вредности на основу овог броја узорака, нарочито кад се ради о процесу уноса и елиминације који се не понаша по моделу кинетике првог реда, па узорковање обављати чешће у току обе фазе (видети Део пети ове методе). Додатни узорци чувају се и анализирају само ако се резултати првог круга анализа покажу неодговарајућима за израчунавање BCF са жељеном прецизношћу.

Пример прихватљивог распореда узимања узорака дат је у Делу четвртом ове методе. Други распореди могу се одредити помоћу других претпостављених вредности K_{ow} за израчунавање трајања изложености у коме долази до 95% уноса.

Узорковање се наставља у току фазе уноса све док се не успостави равнотежно стање или у току 28 дана, зависно од тога који се услов пре испуни. Ако се равнотежно стање не постигне у току 28 дана, узорковање се наставља све до постизања равнотежног стања или до 60 дана, зависно од тога који услов се пре испуни. Пре почетка фазе елиминације, јединке риба се преносе у акваријуме са чистим медијумом.

1.8.4.2. Узимање и припрема узорака

Узорци воде за анализу узимају се нпр. испуштањем воде кроз инертне цеви постављене на средини акваријума. Филтрација ни центрифугирање не одвајају увек фракције испитиване супстанце које нису биодоступне од фракција које јесу биодоступне (важи нарочито за суперлипофилне хемикалије односно оне хемикалије чији је log P_{ow} > 5)[1, 5]. Није увек потребно радити филтрирање или центрифугирање узорака. Уместо тога, потребно је коморе за испитивање држати што чистијим, а у току фаза уноса и фазе елиминације прати се садржај укупног органског угљеника.

При сваком узорковању одговарајући број јединки риба (обично најмање четири) уклања се из коморе за испитивање. Узорковане јединке брзо се испирају водом, обришу од сувишне течности, тренутно убијају на најхуманији начин и измере.

Пожељно је анализирати узорке воде и јединки риба одмах после узорковања, чиме се избегава разградња или други начини губитка и омогућава израчунавање брзина уноса и елиминације у току испитивања. Брзом анализом се омогућава правовремено одређивање тачке постизања равнотежног стања.

Ако се анализа не обави одмах, узорци се чувају на одговарајући начин. Пре почетка испитивања потребно је имати податке о одговарајућим начинима складиштења за испитивану супстанцу, нпр. замрзавање, чување на температури од 4 °C, трајање складиштења, екстракција, итд.

1.8.4.3. Квалитет аналитичког поступка

Метода испитивања зависи од тачности, прецизности и осетљивости примењене аналитичке методе за дату испитивану

супстанцу, па је неопходно испитивањем проверити да ли су прецизност и поновљивост хемијске анализе, као и ефикасност аналитичког поступка за испитивану супстанцу у води и риби, задовољавајући за одређени аналитички поступак. Анализира се и вода за разблаживање на присуство дате испитиване супстанца.

По потреби се коригују вредности C_w и C_f добијене из испитивања и то помоћу вредности ефикасности аналитичке технике и вредности фона у контроли. Потребно је пажљиво руковати узорцима рибе и воде тако да се у највећој могућој мери онемогући контаминација и губици (на пример губици који могу настати услед адсорпције на опрему за узорковање).

1.8.4.4. Анализа узорака рибе

Ако се у испитивању користе обележене супстанце, може се анализирати укупни радио обележени материјал (односно полазна супстанца и њени метаболити), или узорци могу бити пречишћени тако да се полазна супстанце може анализирати посебно. Главни метаболити могу се окарактерисати у равнотежном стању или на крају фазе уноса, зависно од тога који услов се пре испуни. Ако је BCF у смислу укупних радиоактивних резидијума ± 1.000%, саветује се (за одређене категорије хемикалија, као што су пестициди чврсто препоручује) да се идентификују и квантификују продукти разградње који чине ± 10% укупних резидијума у ткиву рибе у равнотежном стању. Ако се идентификују и квантификују продукти разградње који чине ± 10% укупних радиоактивних резидијума у рибљем ткиву, препоручује се и идентификација и квантификација продуката разградње у медијуму.

Концентрација испитиване супстанце се мери у свакој јединки рибе која је претходно измерена. Ако то није могуће, концентрација испитиване супстанце може се одредити у обједињеном узорку, али такво одређивање смањује број статистичких поступака који се могу применити на дате податке. Ако се узимају у обзир специфични статистички поступак и статистичка снага, у испитивање се укључује одговарајући број јединки риба да би се задовољили критеријуми за жељени поступак анализе обједињених узорака и за статистички значај испитивања[6, 7].

BCF се изражава у функцији укупне свеже масе, а за високо липофилне супстанце и у функцији садржаја липида. Садржај липида у рибама одређује се при сваком узимању узорака, уколико је то могуће. За одређивање садржаја липида користе се одговарајуће методе (видети Део четврти[8, 2] ове методе). Као стандардна метода препоручује се техника екстракције хлороформ/метанол[9]. Различите методе дају различите вредности[10], па је важно детаљно описати примењену методу. Анализа садржаја липида по могућности се спроводи у истом екстракту у којем се мери и концентрација испитиване супстанце, с обзиром на то да је често потребно липиде уклонити из екстракта да би се екстракт могао анализирати методом хроматографије. Садржај липида у риби (у mg/kg мокре тежине) на крају испитивања не сме да се разликује за више од ± 25% у односу на садржај на почетку испитивања. Наводи се и проценат суве материје ткива да би се омогућила конверзија вредности концентрације липида у функцији свеже масе у концентрацију липида у функцији суве масе.

2. ПОДАЦИ

2.1. ОБРАДА РЕЗУЛТАТА

Крива уноса за испитивану супстанцу добија се графичким приказом концентрације испитиване супстанце у или на риби (или одређеним ткивима) у фази уноса у функцији времена. Ако је крива достигла плато, односно ако је постала приближно паралелна са x-осом, BCF_{SS}се израчунава формулом:

$$BCF_{SS} = \frac{C_f \text{ као равнотежностање (средња вредност)}}{C_w \text{ као равнотежностање (средња вредност)}}$$

Кад се не достигне равнотежно стање, могуће је израчунати BCF_{SS} који је довољно прецизан за процену ризика из равнотежног стања као 80% ($1{,}6/k_2$) или 95% ($3{,}0/k_2$) еквилибријума.

Одређује се и BCF_K као однос k_1/k_2, две константе кинетике првог реда. Константа брзине елиминације (k_2) обично се одређује из криве елиминације (односно графичког приказа смањења концентрације испитиване супстанце у риби у функцији времена). Затим се израчунава константа брзине уноса (k_1) с обзиром на k_2 и вредност C_f која се одређује из криве уноса (видети Део шести ове методе). Најбољи поступак за одређивање вредности BCFK и констатни k_1 и k_2 је употребом рачунара коришћењем метода за процену нелинеарних параметара[11]. Користи се и графички метод за израчунавање k_1 и k_2. Ако крива елиминације очигледно није крива кинетике првог реда, употребљавају се сложенији модели (видети литературу у Делу четвртом ове методе) и тражи савет статистичара.

2.2. ТУМАЧЕЊЕ РЕЗУЛТАТА

Треба бити опрезан приликом тумачења резултата испитивања када се измерене концентрације испитиване супстанце налазе близу лимита детекције примењене аналитичке методе.

Јасно дефинисане криве уноса и елиминације су индикатори доброг квалитета података. Разлика између вредности константи уноса/елиминације за две примењене концентрације испитиване супстанце је мање од 20%. У извештају о испитивању наводе се и објашњавају опажене значајне разлике у брзинама уноса/елиминације за две примењене концентрације испитиване супстанце. Уобичајено, интервали поверења за вредности BCF из добро осмишљеног и изведеног испитивања износе око ± 20%.

3. ИЗВЕШТАЈ

Извештај садржи податке о:

1. испитиваној супстанци:

– физичка природа и уколико је релевантно, физичка и хемијска својства;

– подаци о хемијској идентификацији (укључујући садржај органског угљеника, уколико је прикладно);

– уколико се испитују обележене супстанце, тачан положај радиоактивно обележених атома и проценат радиоактивности повезан са нечистоћама;

2. врстама које се користе у испитивању:

– латински назив, сој, порекло, претходни третмани (уколико их је било), аклиматизација, узраст, величина јединки, итд.

3. условима испитивања:

– примењени услови испитивања (нпр. проточни или семи-статички);

– тип и својства примењеног осветљења и трајање фотопериода;

– поставка испитивања (нпр. број и величина акваријума, динамика измене медијума у акваријумима, број понављања, број јединки риба по понављању, број концентрација испитиване супстанце, дужина трајања фаза уноса и елиминације, учесталост узимања узорака рибе и воде);

– поступак припреме основних раствора и учесталост измене (уколико се користи растварач за повећање растворљивости испитиване супстанце, наводи се који растварач, његова концентрација и допринос садржају укупном органског угљеника у медијуму);

– номиналне концентрације испитиване супстанце, средње вредности и стандардне девијације концентрација измерених у акваријумима и поступак којим су одређене;

– извор воде за разблаживање, опис сваке претходне обраде, резултати било ког испитивања који потврђује да јединке рибе могу да живе у тој води, као и својства воде: pH вредност, тврдоћа, температура, концентрација раствореног кисеоника, резидијуми хлора (уколико је мерено), укупни органски угљеник, суспендоване материје, салинитет медиума (уколико је примерено) и резултати свих мерења која су урађена у току испитивања;

– квалитет воде у акваријумима, pH вредност, тврдоћа, TOC, температура и концентрација раствореног кисеоника;

– детаљни подаци о храњењу (нпр, врста хране, порекло, састав – ако је могуће, бар садржај липида и протеина, количина хране и учесталост храњења);

– подаци о обради узорака рибе и воде, укључујући детаље о припреми, чувању, екстракцији и аналитичким методама (и прецизност) примењеним на испитиваној супстанци и садржај липида уколико је мерен).

4. резултатима:

– резултати сваког прелиминарног испитивања;

– смртност у контролним и у свим испитиваним групама, као и свако уочено абнормално понашање;

– садржај липида у јединкама рибе (уколико је одређивано у току испитивања);

– криве (укључујући све податке мерења) које показују унос и елиминацију испитиване супстанце из рибе и време до успостављања равнотежног стања;

– C_f и C_w (са стандардном девијацијом и интервалима поверења, уколико је примерено) за сва узорковања (C_f изражен у mg/g мокре тежине (ppm) целе рибе или одређених ткива рибе, нпр. липида, и C_w у mg/g (ppm). C_w вредности за контролу (вредност фона се такође наводи);

– BCF_{SS}, односно BCF_K, уколико је примењиво, 95% интервали поверења за константе брзина уноса и елиминације (све изражене у односу на целу рибу, и укупни садржај липида уколико је измерен, рибе или одређених ткива рибе), интервала поверења и стандардне девијације (уколико се располаже тим подацима) и поступци израчунавања/анализе података за сваку концентрацију испитиване супстанце;

– ако су коришћене обележене супстанце и уколико је захтевано, може се приказати акумулација свих детектованих метаболита;

– сва необична опажања у току испитивања, сва одступања од овде описаних поступака и све остале релевантне информације;

Резултати испод лимита детекције не користе се за израчунавање константи брзина.

4. ЛИТЕРАТУРА

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, p. 29-390.

3. OECD, Paris (1996) Direct Phototransformation of chemicals in water. Environmental Health and Safety Guidance Document Series on Testing and Assessment of Chemicals. No 3.

4. Kristensen P. (1991) BioCOncentration in fish: Comparison of bioconcentration factors derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate organic matter to the bioavailability of chemicals. Water Quality Institute, Denmark.

5. US EPA 822-R-94-002 (1994) Great Lake Water Quality Initiative Technical Support Document for the Procedure to Determine Bioaccumulation Factors. July 1994.

6. US FDA, (Food and Drug Administration) Revision. Pesticide analytical manual, 1, 5600 Fisher's Lane, Rockville, MD 20852, July 1975.

7. US EPA (1974). Section 5, A(1) Analysis of Human or Animal Adipose Tissue, in Analysis of Pesticide Residues in Human and Environmental Samples, Thompson J.F. (ed.) Research Triangle Park, N.C. 27711.

8. Compaan H. (1980) in 'The determination of the possible effects of chemicals and wastes on the aquatic environment: degradation, toxicity, bioaccumulation' Ch. 2.3, Part II. Government Publishing Office, The Hague, The Netherlands.

9. Gardner et al, (1995) Limn. & Oceanogr. 30, p. 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, p. 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

Део други
Хемијска својства одговарајуће воде за разблаживање

	Параметар	Гранична концентрација
1	Суспендове материје	5 mg/l
2	Укупни органски угљеник	2 mg/l
3	Нејонизовани амонијак	1 µg/l
4	Резидијуми хлора	10 µg/l
5	Укупни органофосфорни пестициди	50 ng/l
6	Укупни органохлорни пестициди плус PCB	50 ng/l
7	Укупни органски хлор	25 ng/l
8	Алуминијум	1 µg/l
9	Арсен	1 µg/l
10	Хром	1 µg/l
11	Кобалт	1 µg/l
12	Бакар	1 µg/l
13	Гвожђе	1 µg/l
14	Олово	1 µg/l
15	Никл	1 µg/l
16	Цинк	1 µg/l
17	Кадмијум	100 ng/l
18	Жива	100 ng/l
19	Сребро	100 ng/l

Део трећи
Препоручене врсте риба за испитивања

	Препоручени опсег	Препоручена укупна дужина

	Препоручене врсте	температура (°C)	јединки (cm)
1	*Danio rerio*[IX] (Teleostei, Cyprinidae) (Hamilton-Buchanan), зебрица	20 – 25	3,0 ± 0,5
2	*Pimephales promelas* (Teleostei, Cyprinidae) (Rafinesque)	20 – 25	5,0 ± 2,0
3	*Cyprinus carpio* (Teleostei, Cyprinidae) (Linnaeus), шаран	20 – 25	5,0 ± 3,0
4	*Oryzias latipes* (Teleostei, Poeciliidae) (Temminck and Schlegel)	20 – 25	4,0 ± 1,0
5	*Poecilia reticulata* (Teleostei, Poeciliidae) (Peters), гупи	20 – 25	3,0 ± 1,0
6	*Lepomis macrochirus* (Teleostei, Centrarchidae) (Rafinesque)	20 – 25	5,0 ± 2,0
7	Oncorhynchus *mykiss* (Teleostei, Salmonidae) (Walbaum), калифорнијска пастрмка	13 – 17	8,0 ± 4,0
8	*Gasterosteus aculeatus* (Teleostei, Gasterosteidae) (Linnaeus) кољушка	18 – 20	3,0 ± 1,0

Различите естуарске и морске врсте риба које се користе у другим земљама су: *Leiostomus xanthurus*, *Cyprinodon variegatus*, *Menidia beryllina*, *Cymatogaster aggregata*, *Parophrys vetulus*, *Leptocottus armatus*, *Gasterosteus aculeatus*, *Dicentracus labrax* и *Alburnus alburnus*.

_____

IX Meyer A., Orti G. (1993) Proc. Royal Society of London, Series B., Vol. 252, p. 231

ПРИКУПЉАЊЕ

Наведене врсте риба лако се размножавају и узгајају. У многим деловима света ове врсте риба могу се набавити у току целе године. Како су наведене врсте погодне и за узгајање у лабораторијским условима, здравствено стање и порекло јединки које се користе за испитивање је, уз контролу присуства паразита и болести, увек познато.

Део четврти
ПРЕДВИЂАЊЕ ТРАЈАЊА ФАЗА УНОСА И ЕЛИМИНАЦИЈЕ

1. ПРЕДВИЂАЊЕ ТРАЈАЊА ФАЗЕ УНОСА

Пре извођења испитивања, процена k_2 и процена времена потребног да се успостави равнотежно стање може се добити из емпиријских односа између вредности k_2 и коефицијента расподеле у систему *n*-октанол/вода (P_{ow}) или k_2 и растворљивости у води испитиване супстанце (s).

Процена k_2 (дан$^{-1}$) може се добити, нпр. из следеће емпиријске једначине[1]:

$\log_{10}k_2 = -0.414\times\log_{10}(P_{ow})+1.47\times(r^2 = 0.95)$ (једначина 1)

За остале једначине видети у литератури[2].

Ако подеони коефицијент (P_{ow}) није познат, може се направити процена[3] на основу познавања растворљивости испитиване супстанце у води користећи једначину:

$\log_{10}P_{ow} = 0.862\times\log_{10}(s)+0.710\times(r^2 = 0.994)$ (једначина 2)

при чему:

s јесте растворљивост (mol/l) : (n=36)

Ови односи важе само за супстанце са вредностима log P_{ow} између 2 и 6,5[4].

Време потребно да се постигне одређени проценат равнотежног стања може се добити из опште кинетичке једначине која описује унос и елиминацију (кинетика првог реда):

$$\frac{dC_f}{d_t} = k_1 \times C_w - k_2 \times C_f$$

или ако је вредност C_w константна:

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \times C_w \left(1 - e^{-k_2 t}\right) \qquad \text{(једначина 3)}$$

Кад се приближава достизање равнотежног стања (t®¥), једначина 3 може се свести[5, 6] на:

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \times C_w$$

или

$$\frac{C_f}{C_w} = \frac{k_1}{k_2} = BCF$$

Онда се из израза $k_1/k_2 \times C_w$ може одредити концентрација испитиване супстанце у риби при равнотежном стању ($C_{f,c}$).

Једначина 3 може се претворити у:

$$C_f = C_{f,s} \times \left(1 - e^{-k_2 t}\right)$$

или

$$\frac{C_f}{C_{fs}} = 1 - e^{-k_2 t} \qquad \text{(једначина 4)}$$

Применом једначине 4, време да се достигне одређени проценат равнотежног стања може се предвидети кад се k_2 претходно одреди користећи једначине 1 или 2.

Као смерница, статистички оптимално трајање фазе уноса за добијање статистички прихватљивих података (BCF_K) јесте период потребан да крива која представља лог-трансформисане податке за концентрацију испитиване супстанце у функцији времена достигне средњу тачку, или $1,6/k_2$, или 80% равнотежног стања, али не више од $3,0/k_2$ или 95% равнотежног стања[7].

Време потребно да се достигне 80% равнотежног стања је (једначина 4):

$$0,80 = 1 - e^{-k_2 t_{80}}$$

или

$$t_{80} = \frac{1,6}{k_2} \qquad \text{(једначина 5)}$$

Слично томе, време потребно за достизање 95% равнотежног стања је:

$$t_{95} = \frac{3,0}{k_2} \qquad \text{(једначина 6)}$$

На пример, трајање фазе уноса (up) за испитивану супстанцу са log (P_{ow}) = 4 било би (применом једначина 1, 5 и 6):

$\log_{10} k_2 = -0,414.(4)+1,47$

$k_2 = 0,652$ дана$^{-1}$

up (80%) = 1,6/0,652 односно 2,45 дана (59 сати)

или

up (95%) = 3,0/0,652 односно 4,6 дана (110 сати)

Слично томе, за испитивану супстанцу са s = 10^{-5} mol/L (log (s) = -5,0), трајање фазе уноса било би (применом једначина 1,2,5,6):

$\log_{10}(P_{ow}) = -0,862(-5,0)+0,710 = 5,02$

$\log_{10} k_2 = -0,414.(4)+1,47$

k_2 = 0,246 дана$^{-1}$

up (80%) = 1,6/0,246 односно 6,5 дана (156 сати)

или

up (95%) = 3,0/0,246 односно 12,2 дана (293 сата)

Алтернативно томе, израз:

teq = 6,54 × 10^{-3} P_{ow} + 55,31 (сати)

може се користити да се израчуна време потребно за достизање ефективног равнотежног стања[4].

2. ПРЕДВИЂАЊЕ ТРАЈАЊА ФАЗЕ ЕЛИМИНАЦИЈЕ

Предвиђање времена потребног да се смањи концентрација испитиване супстанце у организму који се користи у овој методи до одређеног процента почетне концентрације може се добити из опште једначине која описује унос и елиминацију (кинетика првог реда)[1, 8].

За фазу елиминације, претпоставља се да је вредност C_w нула. Једначина се може редуковати на:

$$\frac{dC_f}{d_t} = -k_2 C_f$$

или

$C_f = C_{f,o} \times e^{-k2t}$

при чему

$C_{f,0}$ јесте концентрација на почетку периода елиминације.

Елиминација од 50% постиже се у времену t_{50}:

$$\frac{C_f}{C_{f,o}} = \frac{1}{2} = e^{-k_2 t_{50}}$$

или

$$t_{50} = \frac{0,693}{k_2}$$

Слично томе, 95% елиминација постиже се при:

$$t_{95} = \frac{3,0}{k_2}$$

Ако се користи 80% уноса за први период (1,6/k_2) и 95% губитка у фази елиминације (3,0/k_2), онда фаза елиминације траје приближно два пута дуже од фазе уноса.

Ове процене се заснивају на претпоставци да се процеси уноса и елиминације могу описати као кинетика првог реда. Уколико се не понашају по моделу кинетике првог реда, користе се сложенији модели[1].

ЛИТЕРАТУРА

1. Spacie A. and Hamelink J.L. (1982) Alternative models for describing the bioCOncentration of organics in fish. Environ. ToxiCOl. and Chem. 1, pp 309-320.

2. Kristensen P. (1991) BioCOncentration in fish: COmparison of BCF's derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate matter to the bioavailability of chemicals. Danish Water Quality Institute.

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 F., Klein W. and Bourdeau P.H. Part 4.4 pp 243-255. SCOPE, 1985, John Wiley & Sons Ltd. N.Y.

7. Reilly P.M., Bajramovic R., Blau G.E., Branson D.R. and Sauerhoff M.W. (1977) Guidelines for the optimal design of experiments to estimate parameters in first order kinetic models, Can. J. Chem. Eng. 55, pp 614-622.

8. Könemann H. and Van Leeuwen K. (1980) ToxiCOkinetics in fish: Accumulation and Elimination of six Chlorobenzenes by Guppies. Chemosphere, 9, pp 3-19.

Део пети

Пример узорковања за испитивање биоконцентрације за супстанце са log P_{ow} = 4

Узорковање риба	Распоред узимања узорака		Број узорака воде	Број јединки риба по узорку
	Најмања потребна учесталост (у данима)	Додатно узимање узорака		
Фаза уноса	-10		2[X] 2	додати 45-80 риба
1.	0,3	0,4	2 (2)	4 (4)
2.	0,6	0,9	2 (2)	4 (4)
3.	1,2	1,7	2 (2)	4 (4)
4.	2,4	3,3	2 (2)	4 (4)
5.	4,7		2	6
Фаза елиминације				Пренос јединки у акваријум са чистим медијумом
6.	5,0	5,3		4 (4)
7.	5,9	7,0		4 (4)
8.	9,3	11,2		4 (4)
9.	14,0	17,5		6 (4)

_____

X Узорак воде након минумум три замене комплетне запремине акваријума. Вредности у заградама су број узорака (воде, риба) који ће се узети уколико је потребно додатно узорковање.

Напомена: Претходна процена k_2 за log P_{ow} од 4,0 је 0,652 дана$^{-1}$. Укупно трајање испитивања постављено је на 3 × up = 3 4,6 дана, односно 14 дана. За процену „up" видети Део четврти ове методе.

Део шести

Избор модела

Већина података добијених из испитивања биоконцентрације може се добро описати помоћу једноставног двопараметарског модела, што се види из линеаризоване криве за вредности концентрација испитиване супстанце у риби у току фазе елиминације, кад се графички прикаже на семи-логаритамском папиру (када се ова крива не може линеаризовати, употребљавају се сложенији модели[1]).

Графички поступак за одређивање константе брзине елиминације (губитка) k_2

Концентрација испитиване супстанце измерена у сваком узорку рибе графички се приказује у функцији времена узимања узорка на семи-логаритамском папиру. Нагиб те праве је k_2.

$$k_2 = \frac{\ln(C_{f1}/C_{f2})}{t_2 - t_1}$$

Напомена: Одступања од праве линије могу указивати на то да се процес елиминације понаша по моделу који је сложенији од кинетике првог реда.

Графички поступак може се применити за одређивање константе брзине елиминације када дати процес одступа од модела кинетике првог реда.

Графички поступак за одређивање константе брзине уноса k_1

Кад је позната вредност k_2, k_1 се израчунава на следећи начин:

$$k_1 = \frac{C_f k_2}{C_w \times \left(1 - e^{-k_2 t}\right)} \quad \text{(једначина 1)}$$

Вредност C_f очитава се из средње тачке платоа криве уноса која се добија кад се лог-трансформисани подаци за концентрацију графички прикажу у функцији времена.

Компјутерски поступак за израчунавање константи брзина уноса и елиминације (губитка)

Најбољи начин одређивања фактора биоконцентрације и константе брзина k_1 и k_2 јесте да се користе рачунар и метода процене нелинеарних параметара. Овакви компјутерски програми израчунавају вредности за k_1 и k_2 на основу низа података о концентрацијама испитиване супстанце и следећег модела:

$$C_f = C_w \frac{k_1}{k_2} \times \left(1 - e^{-k_2 t}\right) \quad 0 < t < tc \qquad \text{[једначина 2]}$$

$$C_f = C_w \frac{k_1}{k_2} \times \left(e^{-k_2 (t - t_c)} - e^{-k_2 t}\right) \quad t > tc \qquad \text{[једначина 3]}$$

при чему:

t_c јесте време на крају фазе уноса.

Овакав приступ омогућава одређивање стандардне девијације за k_1 и k_2.

У већини случајева k_2 се може проценити из криве елиминације са релативно високом прецизношћу, па с обзиром на то да постоји јака корелација између параметара k_1 и k_2, ако се процењују истовремено, саветује се да се прво израчуна k_2 само из података из фазе елиминације, а након тога да се израчуна k_1 из података из фазе уноса помоћу нелинеарне регресионе анализе.

C.14. ИСПИТИВАЊЕ РАСТА РИБЉЕ МЛАЂИ

Део први

1. МЕТОДА ИСПИТИВАЊА

Метода се заснива на Упутству за испитивање OECD 215 (2000).

1.1. Увод

Метода испитивања осмишљена је за процену ефекта на раст након продуженог излагања рибље млађи хемикалијама. Базира се на методи, која је развијена и испитана међулабораторијским испитивањем[1, 2], за процену ефекта хемикалија на раст рибље млађи калифорнијске пастрмке у проточним условима. Могу се користити и друге добро описане врсте. Постоје искуства са испитивањем раста врсте *Daniorerio*[XI] (зебрица)[3, 4] и *Oryziaslatipes*[5, 6, 7].

Видети и општи увод Прилога 3.

_____

XI 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, 231-236.

1.2. ДЕФИНИЦИЈЕ

Најнижа концентрација која доводи до значајних ефеката (у даљем тексту: LOEC) јесте најнижа концентрација испитиване супстанце при којој је опажен значајан учинак (при $p < 0,05$) у поређењу са контролом. Све испитиване концентрације изнад LOEC потребно је да имају штетне ефекте једнаке или веће од оних опажених при LOEC.

Концентрација која не доводи до значајног ефекта (у даљем тексту: NOEC) јесте концентрација непосредно испод LOEC.

EC_x у овој методи испитивања јесте концентрација испитиване супстанце која доводи до x% промене у брзини раста рибе у поређењу са контролама.

Насад јесте свежа маса риба по запремини воде.

Густина насада јесте број јединки риба по запремини воде.

Специфична брзина раста поједине рибе јесте брзина раста јединке у односу на њену почетну тежину.

Просечна специфична брзина раста по комори за испитивање јесте средња брзина раста популације риба у акваријуму у једном третману (концентрацији).

Псеудоспецифична брзина раста јесте појединачна брзина раста у поређењу са средњом вредношћу почетне тежине популације риба у акваријуму.

1.3. ПРИНЦИП МЕТОДЕ

Рибља млађ у екпоненцијалној фази раста се након мерења ставља у коморе за испитивање и излаже опсегу сублеталних концентрација испитиване супстанце растворене у води ако је могуће у проточним условима, или уколико то није могуће, у одговарајућим полустатичном систему (уз потпуно периодично обнављање испитиваног медијума). Испитивање траје 28 дана. Риба се свакодневно храни. Количина хране одређује се на основу почетне тежине рибе и може се прорачунати након 14 дана. Риба се поновно мери на крају испитивања. Ефекти на стопу раста анализирају се помоћу регресионог модела да би се проценила концентрација која је довела до x% промене у стопи раста, тј. EC_x (нпр. EC_{10}, EC_{20}, или EC_{30}). Алтернативно, подаци се могу поредити са контролним вредностима да би се одредила најнижа концентрација која доводи до значајног ефекта, а затим и концентрација која не доводи до значајног ефекта.

1.4. ПОДАЦИ О ИСПИТИВАНОЈ СУПСТАНЦИ

Треба имати податке о акутној токсичности (видети методу испитивања C.1. која је дата у овом правилнику) из испитивања урађеном, ако је могуће, на истој врсти риба. То значи да је позната растворљивост у води и напон паре испитиване супстанце и да постоји поуздани аналитички поступак за квантификацију супстанце у раствору са познатом и документованом прецизношћу и границом детекције.

Корисни подаци су и структурне формуле, чистоћа супстанце, стабилност у води и на светлу, pK_a, P_{ow} и резултати испитивања брзе биоразградљивости (видети методу испитивања C.4. која је дата у овом правилнику).

1.5. ПРИХВАТЉИВОСТ ИСПИТИВАЊА

Да би испитивање било прихватљиво, потребно је испунити услове:

– смртност у контролама не премашује 10% на крају испитивања,

– пораст средње тежине риба из контролне групе је довољан да омогући детекцију минималне варијације стопе раста која се сматра значајном. Резултати међулабораторијског испитивања[2] са калифорнијском пастрмком показали су да се у току 28 дана средња вредност тежине рибе у контролама повећа најмање за половину (односно 50%) средње вредности њихове почетне тежине; нпр. 1 g/риба (= 100%), коначна тежина након 28 дана: > 1,5 g/риба (> 150%);

– концентрација раствореног кисеоника је најмање 60% вредности засићења ваздуха (air saturation value, у даљем тексту: ASV) у току читавог испитивања;

– температура воде у испитиваним акваријумима међусобно се не разликује за више од ± 1° C у било ком тренутку у току испитивања и одржава се унутар опсега ± 2° C у оквиру препорученог опсега температуре за испитивану врсту (видети Део други ове методе).

1.6. ОПИС МЕТОДЕ

1.6.1. Опрема

У овој методи испитивања користи се уобичајена лабораторијска опрема, а нарочито:

– оксиметар и pH-метар;

– опрема за одређивање тврдоће воде и алкалитета;

– одговарајућа опрема за контролу температуре и ако је могуће континуирани надзор;

– коморе за испитивање од хемијски инертног материјала и погодног капацитета сходно препорученом насаду и густини насада (видети одељак 1.8.5. и Део други ове методе);

– прецизна вага (тачност ± 0,5%).

1.6.2. Вода

У испитивању се користи свака вода у којој испитивана врста показује задовољавајуће преживљавање и раст у дужем временском периоду. Вода да буде сталног квалитета у току читавог трајања испитивања. Вредност pH воде да буде унутар опсега од 6,5 до 8,5 и у току сваког конкретног испитивања да буде унутар опсега од ± 0,5 pH јединица. Препоручује се тврдоћа изнад 140 mg/l $CaCO_3$). Да би се предупредио прекомеран утицај воде за разблаживање на резултате испитивања (нпр. комплексирањем испитиване супстанце), узимати узорке за анализу у одређеним интервалима. Садржај тешких метала (нпр. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd и Ni), главних анјона и катјона (нпр. Ca, Mg, Na, K, Cl и SO_4), пестицида (укупни органофосфорни и органохлорни пестициди) укупног органског угљеника и суспендованих материја одредити свака три месеца ако се зна да је вода за разблаживање релативно сталног квалитета. Ако је вода показала константан квалитет у току претходних годину дана, анализе се раде ређе, а интервали су дужи (сваких 6 месеци). Нека прихватљива хемијска својства воде за разблаживање наведена су у Делу другом ове методе.

1.6.3. Раствори испитиваних супстанци

Раствори одабраних концентрација тест супстанце припремају се разблаживањем основног раствора.

Основни раствор би, ако је могуће, требало припремити једноставним мешањем или мућкањем испитиване супстанце у води механичким путем (нпр. мешањем или ултразвучно). За припрему одговарајућег концентрованог основног раствора могу се користити колоне засићења (колоне растворљивости).

У неким случајевима је потребно коришћење растварача или дисперзионог средства (средства за повећање растворљивости) да би се припремио основни раствор одговарајуће концентрације. У погодне раствараче убрајају се ацетон, етанол, метанол, диметилсулфоксид, диметилформамид и триетиленгликол. Погодна средства за дисперзију су Cremophor RH40, Tween 80, метилцелулоза 0,01% и HCO-40. Потребан је опрез при коришћењу лако биоразградљивих средстава (нпр. ацетона), односно високо испарљивих једињења, јер могу створити проблеме са повећањем броја бактерија у проточним условима. Ако се користи средство за повећање растворљивости, оно не сме имати значајне ефекте на раст риба ни видљиве штетне ефекте на рибљу млађ, што се може утврдити контролним третманом у коме се рибе излажу само дејству растварача.

Код испитивања у проточним условима потребан је систем који континуирано отпушта и разређује основни раствор испитиване супстанце (нпр. мерна пумпа, систем за пропорционално разблаживање, систем за регулацију засићења) да би се у испитиване акваријуме доставила серија различитих концентрација. Током испитивања, проток основних раствора и воде за разблаживање проверава се у одређеним интервалима, ако је могуће сваког дана, и не варира више од 10% у току читавог испитивања. Резултати међулабораторијског испитивања[2] показали су да је 6 L по граму рибе на дан прихватљива учесталост уклањања воде за калифорнијску пастрмку у току испитивања (видети одељак 1.8.2.2. ове методе).

Код испитивања у полустатичном систему (са комплетним периодичним обнављањем медијума), учесталост обнављања медијума зависи од стабилности испитиване супстанце, али се препоручује дневно обнављање. Ако прелиминарна испитивања стабилности (видети одељак 1.4. ове методе) покажу да концентрација испитиване супстанце није стална (односно налази се изван опсега 80% до 120% номиналне концентрације или пада испод 80% измерене почетне концентрације) у току периода обнове, испитивање урадити у проточном систему.

1.6.4. Избор врсте за испитивање

За испитивање се препоручује калифорнијска пастрмка, јер је на овој врсти[1, 2] добијено највише података у међулабораторијским испитивањима. Користе се и друге добро описане врсте, али се у том случају поступак испитивања прилагођава да би се створили погодни услови испитивања. Постоје искуства са испитивањем раста врсте *Daniorerio* (зебрица)[3, 4] и *Oryziaslatipes*[5, 6, 7]. Када се у испитивању користе друге врсте, наводи се разлог за њихов избор, као и за избор методе испитивања.

1.6.5. Узгој рибе

Јединке се бирају из популације риба из истог узгоја, ако је могуће из истог мреста и узгајају најмање две недеље пре испитивања у условима сличним онима који се користе у испитивању, првенствено у погледу квалитета воде и осветљења. Риба се храни минималним оброцима који износе 2% телесне тежине дневно, а ако је могуће 4% телесне тежине дневно у току целог периода узгоја и испитивања.

Након 48 сати привикавања, записује се колика је смртност и примењују се критеријуми:

– ако је смртност изнад 10% популације у року од 7 дана, читава серија се одбацује;

– ако је смртност између 5% и 10% популације, риба се аклиматизује додатних 7 дана;

– ако је смртност већа од 5% у току следећих 7 дана, читава серија се одбацује;

– ако је смртност мања од 5% популације у 7 дана, прихвата се читава серија.

Две недеље пре, као ни у току испитивања риба се не сме лечити од болести.

1.7. ПОСТАВКА ИСПИТИВАЊА

„Поставка испитивања" односи се на избор броја и размака у серији испитиваних концентрација, број акваријума са сваком појединoм концентрацијом и број риба по акваријуму. У идеалном случају, испитивана поставка се бира на основу:

– циља испитивања;

– статистичке анализе која ће се користити;

– расположивости и цене испитивања ресурса.

У опису циља испитивања прецизирати статистичку снагу при којој је потребно одредити минималну статистички значајну разлику изабраног параметра (нпр. брзина раста) или захтевану прецизност при процени EC_x (нпр. са x = 10, 20 или 30, ако је могуће не мањи од 10). Без тога се не може тачно препоручити обим испитивања.

Поступак испитивања који је оптималан (јер најбоље искоришћава ресурсе) при примени једне методе статистичке анализе, није нужно оптималан за другу врсту статистичке анализе. Препоручени поступак испитивања за процену LOEC/NOEC није исти као поступак који се препоручује за регресиону анализу.

У већини случајева, регресиона анализа има предност над анализом варијансе[8]. Кад се не може пронаћи одговарајући регресијски модел ($p^2 < 0,9$) користи се NOEC/LOEC.

1.7.1. Поставка испитивања за регресиону анализу

При поставци испитивања чији ће резултати бити анализирани регресионим моделима узети у обзир аспекте:

– ефективна концентрација (нпр. $EC_{10,20,30}$) и опсег концентрација у ком се јавља ефекат испитиване супстанце који нас занима налази се унутар опсега концентрација које се примењују у испитивању. Највећа прецизност којом се процењује ефективна концентрација постиже се кад се ефективна концентрација налази у средини опсега концентрација које се користе у испитивању. Прелиминарно испитивање у циљу одређивања опсега концентрација помаже у избору одговарајуће серије испитиваних концентрација;

– поставља се најмање једна контролна и пет додатних комора за испитивање са различитим концентрацијама да би се омогућило задовољавајуће статистичко моделовање. У случајевима кад се користи средство за повећање растворљивости, уз серију акваријума са испитиваном супстанцом потребно је поставити једну контролу која садржи средство за повећање растворљивости у највишој тест концентрацији (видети одељке 1.8.3. и 1.8.4. ове методе);

– могу се користити одговарајући геометријске или логаритамске серије[9] (видети Део четврти ове методе). Предност се даје логаритамској расподели концентрација испитиване супстанце;

– ако је на располагању више од шест комора за испитивање, додатне се користе за понављање, или се расподељују унутар опсега концентрација испитиване супстанце, како би разлика између појединих концентрација била мања. Обе мере су подједнако добре.

1.7.2. Поставка испитивања за процену NOEC/LOEC помоћу анализе варијансе (ANOVA)

За сваку испитивану концентрацију, ако је могуће, поставити по две коморе за испитивање са истом концентрацијом испитиване супстанце, а статистичка анализа се ради на нивоу коморе[10]. Ако се не користе понављања (реплике), не сме постојати никаква варијабилност између комора за испитивање осим варијабилности на нивоу јединки. Искуство је показало[11] да је у конкретном случају варијабилност између комора била врло мала у поређењу са варијабилношћу унутар комора (тј. између јединки у једној комори), па је статистичка анализа која се ради на нивоу јединке у тесту релативно прихватљива алтернатива.

Обично се користи најмање пет тест концентрација у геометријској серији са фактором који ако је могуће није већи од 3,2.

Када се изводи испитивање у дупликату, број реплика контролне групе, самим тим и број риба, је двоструко већи од броја који се користи за сваку испитивану концентрацију, а које су исте величине[12, 13, 14]. Кад нема реплика, број јединки у контролној групи је исти као и број јединки за сваку испитивану концентрацију.

Ако се анализа варијансе (Analysis of Variance, у даљем тексту: ANOVA) ради на нивоу коморе, а не на бази јединке, што повлачи означавање појединих риба или употребу псеудо специфичних брзина раста (видети одељак 2.1.2. ове методе), поставити довољан број дупликата комора да би се омогућило одређивање стандардне девијације између комора унутар испитиване концентрације. То значи да степени слободе[10] за грешку у анализи варијансе износе најмање 5. Ако се поставе само дупликати контрола, постоји опасност од помака варијабилности грешке, јер се она може повећавати како се повећава средња вредност брзине раста. С обзиром на то да ће се брзина раста највероватније смањивати са повећањем концентрације, постоји могућност да се варијабилност прецени.

1.8. ПОСТУПАК

1.8.1. Избор и мерење испитиваних јединки риба

Важно је свести на минимум варијације у тежини рибе на почетку испитивања. Одговарајући опсег величине за различите врсте риба препоручене за употребу у овој методи испитивања наведени су у Делу другом ове методе. За читаву

серију јединки риба употребљених у испитивању, тежина јединки на почетку испитивања у идеалном случају је унутар опсега од ± 10% аритметичке средине тежине и ни у ком случају не премашује 25%. Препоручује се мерење подузорка јединки риба пре испитивања да би се проценила средња тежина.

Популација рибе из истог узгоја намењена за испитивање не храни се 24 сата пре испитивања. Јединке се затим бирају случајним избором. Применом опште анестезије (нпр. водени раствор 100 mg/l трикаин-метан сулфоната (MS 222) неутралисаног додатком два дела натријум-бикарбоната на један део MS 222), свака јединка се измери и одреди јој се свежа маса (риба се претходно обрише да се уклони сувишна вода) са тачношћу која је наведена у Делу другом ове методе. Рибе чија се телесна тежина налази унутар одабраног опсега задрже се и затим насумично распоређују у коморе за испитивање. Записује се укупна свежа маса риба у свакој комори. Употреба анестетика као и манипулација рибом (укључујући брисање и мерење) може проузроковати стрес и озледе рибље млађи, посебно код врста риба које су мале величине. Рибљом млађи се рукује пажљиво да би се избегао стрес и повреда животиња укључених у испитивање.

Риба се поновно мери 28. дана испитивања (видети одељак 1.8.6. ове методе). Ако се сматра да је неопходно прерачунати количину хране, риба се може поновно мерити и 14. дана испитивања (видети одељак 1.8.2.3. ове методе). За одређивање промене у величини рибе према којој ће се прилагодити оброци хране могу се користити и други поступци, као што је фотографска метода.

1.8.2. Услови излагања

1.8.2.1. Дужина

Испитивање траје ≥ 28 дана.

1.8.2.2. Насад и густина насада

Важно је да насад и густина насада одговарају врсти риба која се користи у испитивању (видети Део други ове методе). Ако је густина насада превисока, наступиће стрес због пренасељености, који може проузроковати смањене брзине раста и створити могућност за развој болести. Ако је густина насада прениска, може изазвати територијално понашање у риба, које може да утиче на раст. Насад је довољно низак да се концентрација растворeног кисеоника може одржавати без аерације на нивоу од најмање 60% ASV. Међулабораторијско испитивање показало је да прихватљива густина насада за калифорнијску пастрмку износи 16 јединки од 3 g до 5 g на запремину од 40 литара. Препоручена учесталост уклањања воде у току испитивања је 6 L по граму рибе на дан.

1.8.2.3. Исхрана

Риба се храни одговарајућом врстом хране (видети Део други ове методе) и задовољавајућом количином хране која омогућава прихватљиву брзину раста. Не сме доћи до раста микроорганизама и замућивања воде. За калифорнијску пастрмку, брзина од 4% њихове телесне тежине по дану вероватно ће задовољити ове услове[2, 15, 16, 17]. Дневни оброк може да се подели у два једнака дела и да се да рибама у два оброка дневно, у размаку од најмање 5 сати. Оброк се базира на почетној укупној тежини рибе у појединачном акваријуму. Ако се риба поновно мери 14. дана, оброк се прерачунава. Храну рибама ускратити 24 сата пре мерења.

Непоједена храна и фекални садржај се свакодневно уклањају из акваријума пажљивим чишћењем дна сваког акваријума и то помоћу усисавања.

1.8.2.4. Светлост и температура

Светлосни режим и температура воде одговарају врсти рибе која се користи у испитивању (видети Део други ове методе).

1.8.3. Концентрације испитиване супстанце

Обично је потребно пет различитих концентрација испитиване супстанце без обзира на испитивану поставку (видети одељак 1.7.2. ове методе). Претходно познавање токсичности испитиване супстанце (нпр. из испитивања акутне токсичности, односно из прелиминарног испитивања за одређивање опсега концентрација) може да помогне у избору одговарајућих услова испитивања. Ако се испитивање обавља у мање од пет концентрација, наводи се објашњење. Највиша концентрација тест супстанце не сме да буде већа од границе растворљивости супстанце у води.

Кад се користи средство за повећање растворљивости као помоћ у припреми основног раствора, коначна концентрација тог средства није већа од 0,1 ml/l и ако је могуће иста је у свим коморама за испитивање (видети одељак 1.6.3. ове методе). Избегавати употребу таквих средстава кад год је могуће.

1.8.4. Контроле

Број контрола са водом за разблаживање зависи од испитиване поставке (видети одељак 1.7. до 1.7.2. ове методе). Ако се користи средство за повећање растворљивости, поставља се онолико контрола са средством за повећање растворљивости колико има контрола са водом за разблаживање.

1.8.5. Учесталост аналитичких одређивања и мерења

Током испитивања, концентрације испитиване супстанце одређују се у регуларним интервалима.

У проточном систему, проток разблаживача и токсични основни раствори контролишу се у одређеним интервалима, ако је могуће сваког дана. Не варирају више од 10% у току читавог испитивања. Где се очекиване концентрације испитиване супстанце налазе унутар ± 20% номиналних вредности (тј. унутар опсега 80% до 120%, видети одељке 1.6.2. и 1.6.3. ове

методе), препоручује се да се анализирају најмање највиша и најнижа концентрација на почетку испитивања и након тога у недељним интервалима. У случајевима када се не очекује да ће концентрација остати унутар ± 20% номиналне (на основу података о стабилности тест супстанце), анализирати све испитиване концентрације, али према истом распореду.

У полустатичном систему (са потпуним периодичним обнављањем медијума) у којима се очекује да ће концентрација испитиване супстанце остати унутар ± 20% номиналне вредности, препоручује се да се анализирају најмање највиша и најнижа концентрација непосредно након припреме и непосредно пре обнављања на почетку испитивања, а након тога једном недељно. У случајевима када се не очекује да ће концентрација испитиване супстанце бити унутар ± 20% номиналне, све концентрације анализирати по истом поступку и распореду какви се користе за стабилније материје.

Препоручује се да се резултати базирају на измереним концентрацијама. Ако је доказано да се концентрација испитиване супстанце у раствору одржавала унутар ± 20% номиналне или измерене почетне концентрације у току читавог трајања испитивања, резултати се могу базирати на номиналним или измереним вредностима.

Узорци се по потреби филтрирају (нпр. коришћењем величине пора од 0,45 mm) или центрифугирају. Препоручује се центрифугирање. Ако се испитивани материјал не адсорбује на филтере, филтрација може да буде прихватљив поступак.

Растворени кисеоник, pH и температура мере се у свим коморама у току испитивања. Укупна тврдоћа, алкалитет и салинитет (уколико је релевантан) мере се у контролама и једној комори за испитивање са највишом концентрацијом. Растворени кисеоник и салинитет (уколико је релевантан) мере се најмање три пута (на почетку, средини и крају испитивања). Код испитивања у полустатичким условима, препоручује се чешће мерење растворeног кисеоника, ако је могуће пре и након сваког обнављања воде или најмање једном недељно. Вредност pH се мери на почетку и крају сваког обнављања воде у испитиваној поставци са статичким обнављањем и најмање једном недељно у проточним условима. Тврдоћа и алкалитет се мере једном у току сваког испитивања. Температура се, ако је могуће, непрекидно прати у најмање једној комори.

1.8.6. Опажања

Прати се тежина риба. На крају испитивања, сва преживела риба се измери и одреди се свежа маса (након брисања сувишне воде) изражено за целу групу риба по комори или за јединку. Мерење риба по групама из појединачних комора има предност над мерењем појединачних јединки, јер овај други начин захтева да риба буде појединачно означена. У случају мерења тежине поједине рибе да би се одредила специфична стопа раста рибе, одабрана техника означавања не сме да изазове стрес код испитиваних јединки (погодна алтернатива хладном жигосању је коришћење танког пецарошког канапа у боји).

Риба се у току трајања испитивања свакодневно прегледа, а све спољашње абнормалности (као што су крварење, промена боје) и абнормално понашање се бележе. Бележи се и смртност, а мртву рибу што пре уклонити из комора. Мртва риба се не замењује живом, јер су насад и густина насада довољне да промена у броју јединки у комори неће имати никакве ефекте на раст. Количину хране прилагодити.

2. ПОДАЦИ И ИЗВЕШТАЈ

2.1. ОБРАДА РЕЗУЛТАТА

Препоручљиво је укључити статистичара у процес избора испитиване поставке и анализу података, с обзиром да су овом методом испитивања допуштене значајне варијације у извођењу, нпр. у броју комора, испитиваних концентрација, риба, итд. С обзиром на опције које стоје на располагању у смислу испитиване поставке, овде се не дају посебне смернице у погледу статистичких поступака.

Брзине раста се не израчунавају за коморе у којима је смртност већа од 10%. Стопа смртности наводи се за све испитиване концентрације.

Било који поступак да се користи за анализу података, увек се одређује посебна брзина раста r између времена t_1 и времена t_2. Може се дефинисати на неколико начина, у зависности од тога да ли је риба била појединачно означена или се тражи просек по комори.

$$r_1 = \frac{\log_e w_2 - \log_e w_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

$$r_2 = \frac{\log_e w_2 - \log_e w_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

$$r_3 = \frac{\log_e w_2 - \log_e w_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

при чему:

r_1 јесте специфична брзина раста поједине рибе;

r_2 јесте просечна брзина раста специфична за комору;

r_3 јесте „псеудо” специфична брзина раста;

w_1 и w_2 јесу тежине одређене рибе у времену t_1 односно времену t_2;

$\log_e w_1$ јесте логаритам тежине појединe рибе на почетку испитивања;

$\log_e w_2$ јесте логаритам тежине појединe рибе на крају испитивања;

$\log_e w_1$ јесте просек логаритских вредности w_1 за рибу у комори на почетку испитивања;

$\log_e w_2$ јесте просек логаритамских вредности w_2 за рибу у комори на крају испитивања;

t_1 и t_2 јесу време (дани) на почетку и крају испитиваног периода.

r_1, r_2 и r_3 могу се израчунати за период од 0 до 28 дана и, уколико је примерено (тј. кад се радило мерење 14. дана) за периоде од 0 до 14 и од 14 до 28 дана.

2.1.1. Регресиона анализа резултата (моделовање одговора на концентрацију)

Овом методом анализе утврђује се погодан математички однос између специфичне брзине раста и концентрације, што омогућава процену EC_x, тј. сваке тражене ЕС вредности. Помоћу овог поступка, није потребно израчунавати р за сваку појединy рибу (r_1), већ се анализа може базирати на просеку комора за испитивањеr (r_2). Предност се даје другом поступку, који више одговара и у случају употребе најмањих врста.

Просек специфичне брзине раста за комору (r_2) графички се приказује у односу на концентрацију, да би се утврдила дозна зависност.

Да би се изразио однос између r_2 и концентрације, изабрати одговарајући модел, а избор одређеног модела аргументовати на одговарајући начин.

Ако се број преживелих јединки риба разликује од једне до друге коморе, модел адаптирати, тако да се пондирањем превазиђе проблем неједнаке величине група.

Поступак адаптације на модел омогућава процену, нпр. EC_{20} и њеног расипања (стандардне грешке или интервала поверења). График адаптације на модел приказати у односу на податке, тако да се види да је адаптација на модел била примерена[8, 18, 19, 20].

2.1.2. Анализа резултата за процену LOEC

Ако су у испитивању коришћени дупликати комора за сваку испитивану концентрацију, процена LOEC се може базирати на ANOVA просечне специфичне стопе раста риба по комори (видети одељак 2.1. ове методе). Након ове анализе може следити одговарајући поступак[12, 13, 14, 21] поређења просечног r за сваку концентрацију са просечним r за контроле, да се идентификује најнижа концентрација при којој постоји значајна разлика на нивоу вероватноће од 0,05. Ако нису задовољене потребне претпоставке за параметарску статистику – ненормална дистрибуција или хетерогена варијанса, пре ANOVA подаци се могу трансобразовати да би се хомогенизовале варијансе или се може урадити пондирана ANOVA.

Ако у испитивању нису коришћени дупликати комора за сваку концентрацију, ANOVA на бази података за целукомору неће бити осетљива или је неће бити могуће урадити. Компромис је да се уради ANOVA на „псеудо” специфичним стопама раста r_3 за појединачне јединке риба.

Просечни r_3 за сваку концентрацију може се затим поредити са просечним r_3 за сваку контролу. LOEC се може идентификовати као и раније. Овај поступак не трпи, нити спречава, варијабилност између комора, осим варијабилности која постоји због варијабилности између појединих јединки риба. Искуство је показало[8] да је варијабилност између комора врло мала у поређењу са варијабилношћу између јединки. Ако се појединачне јединке риба не укључе у анализу, описати поступак идентификације екстремних вредности и оправдати његову употребу.

2.2. ТУМАЧЕЊЕ РЕЗУЛТАТА

Резултати се тумаче са опрезом кад се измерене токсичне концентрације у растворима налазе близу границе детекције примењеног аналитичког поступка, или кад се у полустатичном систему за испитивање смањи концентрација испитиване супстанце између свеже припремљеног раствора и пре обнављања.

2.3. ИЗВЕШТАЈ О ИСПИТИВАЊУ

Извештај о испитивању садржи податке о:

1. испитиваној супстанци:

– природа супстанце и релевантна физичка и хемијска својства;

– подаци о хемијској идентификацији, укључујући чистоћу и аналитички поступак за квантификацију испитиване супстанце уколико је применљиво.

2. испитиваној врсти:

– латински назив, ако је могуће: сој, величина, добављач, претходна обрада (ако је рађена) итд.

3. условима испитивања:

– примењени поступак (нпр. статички, полустатички, проточни и др);

– испитивана поставка (нпр. број акваријума, концентрације и дупликати, број риба по комори);

– поступак припреме основног раствора и учесталост обнављања (навести ако се користило средство за повећање растворљивости и његова концентрација);

– номиналне концентрације тест супстанце, средња вредност измерених вредности и њихове стандардне девијације у коморама и метода којом су добијене, као и доказ да се мерења односе на концентрације испитиване супстанце у правом раствору;

– својства воде за разблаживање: pH, тврдоћа, алкалитет, температура, концентрација растворeног кисеоника, ниво резидуалног хлора (уколико је мерен), укупни органски угљеник, суспендоване честице, салинитет медијума (уколико је мерен) и сва друга обављена мерења;

– квалитет воде у коморама (pH, тврдоћа, температура и концентрација растворeног кисеоника);

– детаљне податке о исхрани (нпр. врста, порекло и количина хране, ако и динамика исхране).

4. резултатима:

– доказ да су контроле задовољиле критеријуме прихватљивости што се тиче преживљења и подаци о смртности при свакој појединој концентрацији тест супстанце;

– коришћене статистичке аналитичке технике, статистика утемељена на дупликатима мерења или на јединки, обрада података и оправдање за примењене технике;

– подаци наведени у табели о тежини појединачних риба и средњој тежини риба нултог, 14. (уколико се тежина мерила 14. дана) и 28. дана просечне вредности по акваријуму или псеудоспецифичне брзине раста (уколико је примерено) за период од 0. до 28. дана и ако је могуће од 0. до 14. као и од 14. до 28. дана;

– резултати статистичке анализе (тј. регресионе анализе или ANOVA) ако је могуће дати табеларно или у графичком облику и LOEC (p = 0,05) и NOEC или EC_x са, кад је могуће, стандардним грешкама (уколико је примерено);

– појава свих необичних реакција риба и сваког видљивог ефекта који узрокује испитивана супстанца.

3. ЛИТЕРАТУРА

1. Solbe J.F. de LG (1987) Environmental Effects of Chemicals (CFM 9350 SLD). Report on a UK Ring Testof a Method for Studying the Effects of Chemicals on the Growth rate of Fish. WRc Report No PRD1388-M/2.

2. Ashley S., Mallett M.J. and Grandy N.J., (1990) EEC Ring Test of a Method for Determining the Effects ofChemicals 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,p. 1855-1870.

4. Nagel R., Bresh H., Caspers N., Hansen P.D., Market M., Munk R., Scholz N. and Höfte B.B., (1991) Effectof 3,4-dichloroaniline on the early life stages of the Zebrafish (*Brachydanio rerio*): results of a comparativelaboratory study. Ecotox. Environ. Safety, 21, p. 157-164.

5. Yamamoto, Tokio., (1975) Series of stock cultures in biological field. Medaka (killifish) biology andstrains. Keigaku Publish. Tokio, Japan.

6. Holcombe, G.W., Benoit D.A., Hammermeister, D.E., Leonard, E.N. and Johnson, R.D., (1995) Acute andlong-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 testswith Japanese medaka (*Oryzias latipes*). Ecological Research Series EPA-600/3-91-063. U.S. EnvironmentalProtection Agency, Duluth, Minesota.

8. Stephan C.E. and Rogers J.W., (1985) Advantages of using regression analysis to calculate results ofchronic 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 onthe 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 aCOntrol, 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 areCompared 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 differentColoured food to determine food intake by individual rainbow trout, Oncorhynchus mykiss: effect of feedinglevel. Aquaculture 120, p. 123-133.

16. Quinton, J. C. and Blake, R.W., (1990) The effect of feed cycling and ration level on the Compensatorygrowth response in rainbow trout, Oncorhynchus mykiss. Journal of Fish Biology, 37, p. 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. p. 288.

18. Bruce, R.D. and Versteeg D.J., (1992) A statistical procedure for modelling continuous toxicity data.Environ. Toxicol. Chem. 11, p. 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 andinterlaboratory study. report EA-6189 (American Petroleum Institute Publication, No 4468). ElectricPower Research Institute, Palo alto, CA.

20. Norbert-King T.J., (1988) An interpolation estimate for chronic toxicity: the ICp approach. USEnvironmental Protection Agency. Environmental Research Lab., Duluth, Minesota. Tech. Rep. No 05-88of 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.

Део други

Врсте риба препоручене за испитивање и погодни услови испитивања

Врста	Препоручени опсег температуре (°C)	Фото-период (h)	Препоручени опсег за почетну тежину рибе (g)	Тражена прецизност мерења	Насад Стопа оптерећења (g/l)	Густина насада (по литри)	Храна – дужина испитивања (у данима)
Препоручене врсте:							
Oncorhynchus *mykiss* (калифорнијска пастрмка)	12,5-16,0	12-16	1-5	до најближих 100 mg	1,2-2,0	4	сува ≥ 28 храна за млађ салмонида
Остале добро описане врсте:							
Danio rerio (зебрица)	21-25	12-16	0,050-0,100	до најближих 1 mg	0,2-1,0	5-10	жива храна ≥ 28 *(Brachionus Artemia)*
Oryzias latipes	21-25	12-16	0,050-0,100	до најближих 1 mg	0,2-1,0	5-20	жива храна ≥ 28 *(Brachionus Artemia)*

Део трећи

Хемијска својства воде за разблаживање прихватљивог квалитета

СУПСТАНЦА	КОНЦЕНТРАЦИЈА
Честице	< 20 mg/l
Укупни органски угљеник	< 2 mg/l
Нејонизовани амонијак	< 1 µg/l
Резидуални хлор	< 10 µg/l
Укупни органофосфатни пестициди	< 50 ng/l
Укупни органохлорни пестициди плус полихлоровани бифенили	< 50 ng/l
Укупни органски хлор	< 25 ng/l

Део четврти
Логаритамски низови концентрација које су погодне за испитивање токсичности[9]

Колона (број концентрација између 100 и 10 или између 10 и 1)[XII]						
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

_____

XII Низ од пет (или више) узастопних концентрација може се изабрати из једне од колона у табели. Средња тачка између две концентрација у n-тој колони проналазе се у колони 2n + 1. Наведене вредности су концентрације изражене у запреминским или масеним процентима (mg/l или µg/l). Вредности се могу множити или делити за фактор 10,по потреби. Колона 1 може се користити ако постоји значајна несигурност у вези са нивоом токсичности.

C.15. РИБЕ: МЕТОДА ИСПИТИВАЊА КРАТКОРОЧНЕ ТОКСИЧНОСТИ НА ЕМБРИОНАЛНОМ И ЛАРВАЛНОМ СТАДИЈУМУ

Део први

1. МЕТОДА ИСПИТИВАЊА

Метода се заснива на Упутству за испитивање OECD 212 (1998).

1.1. УВОД

Метода испитивања краткорочне токсичности на ембрионе и ларве риба је краткорочни тест у оквиру ког се испитиваној супстанци излажу различити развојни стадијуми рибе, од тек оплођеног јајета па све до стадијума на истеку фазе храњења путем жуманчане кесе. У методи којом се испитује токсичност на ембрионални и ларвени стадијум храна се не додаје па се испитивање окончава у фази док се ларве још хране путем жуманчане кесе.

Намена методе је одређивање леталних и у извесној мери, сублеталних ефеката хемикалија на специфичне развојне стадијуме и испитиване врсте. Метода испитивања пружа корисне податке који могу:

1. представљати спону између испитивања леталног и сублеталног дејства,

2. бити коришћена као скрининг тест у оквиру испитивања токсичности у целој раној фази живота или у оквиру испитивања хроничне токсичности и

3. бити коришћена за испитивање врста чије технике узгоја нису довољно узнапредовале да би омогућиле студије раздобља промене из ендогеног у егзогени начин исхране.

Прецизну процену хроничне токсичности хемикалије на испитивану врсту могу дати искључиво испитивања која обухватају све фазе животног циклуса рибе. Свако скраћивање излагања, које није обухватило све фазе животног циклуса, може смањити осетљивост методе испитивања и потценити хроничну токсичност хемикалије. Очекује се да ће испитивање на ембрионалном и ларвалном стадијуму бити мање осетљиво од испитивања токсичности у целој раној фази живота, посебно ако се испитује токсичност изразито липофилних хемикалија (log P_{ow}> 4) и хемикалија специфичног токсичног дејства. Код хемикалија неспецифичног, наркотичког деловања, очекује се да разлике у осетљивости буду мање[1].

Пре објављивања овог испитивања, највише искустава у испитивању токсичности на ембрионални и ларвални стадијум сакупљено је на слатководној риби *Danio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae) – тзв. зебрица. Смернице за испитивања ове врсте рибе дате су у Делу другом ове методе. Могу се користити и друге добро проучене врсте (Табела 1).

1.2. ДЕФИНИЦИЈЕ

Најнижа ефективна концентрација (Lowest Observed Effect Concentration, у даљем тексту: LOEC) јесте најнижа концентрација испитиване супстанце при којој је уочено да супстанца, у поређењу са контролном групом, изазива значајно дејство (код $p < 0,05$). Све концентрације више од LOEC у току испитивања имају штетно дејство једнако оном или веће од оног уоченог при LOEC.

Концентрација која не доводи до уочљивог ефекта (No Observed Effect Concentration, у даљем тексту: NOEC) јесте концентрација испитиване супстанце непосредно испод LOEC.

1.3. ПРИНЦИП МЕТОДЕ

Ембриони и ларве риба излажу се серији концентрација испитиване супстанце растворене у води. У оквиру испитиване поставке, могућ је избор семистатичких или проточних услова. Избор зависи од природе испитиване супстанце. Испитивање започиње постављањем оплођених јаја у коморе за испитивање, а завршава се непосредно пре него жуманчана кеса било које ларве, у било којој од испитиваних комора, буде у потпуности апсорбована, односно пре него што се у контролној групи уочи смртност услед изгладњивања. Процењују се летални и сублетални ефекти, који се затим пореде са вредностима у контроли, да би се одредила најнижа ефективна концентрација а тиме и концентрација која не доводи до уочљивог ефекта. Резултати се могу анализирати и помоћу регресионог модела, да би се проценила концентрација испитиване супстанце која доводи до одређеног процентуалног ефекта (LC/EC_x, при чему је *x* проценат ефекта).

1.4. ПОДАЦИ О ИСПИТИВАНОЈ СУПСТАНЦИ

На располагању је потребно имати резултате испитивања акутне токсичности (видети Методу C.1. која је дата у овом прилогу), ако је могуће на истој врсти која је изабрана за испитивање. Резултати могу бити од помоћи при избору прикладног опсега концентрација испитиване супстанце за методу испитивања на раним стадијумима развоја. Потребно је познавати растворљивост испитиване супстанце у води (укључујући и растворљивост у води која се користи за испитивање) и напон пара испитиване супстанце. Потребно је и поуздана аналитичка метода којом се може одредити количина испитиване супстанце у растворима о чијој тачности и граници детекције постоје доступни подаци.

У податке о испитиваној супстанци који су од користи при успостављању услова испитивања у којима се обавља испитивање, спадају структурна формула испитиване супстанце, подаци о хемијској чистоћи, фотостабилности, стабилности у испитиваним условима, pK_a, P_{ow} и резултати испитивања биоразградљивости (видети Методу C.4. која је дата у овом прилогу).

1.5. ПРИХВАТЉИВОСТ ИСПИТИВАЊА

Да би испитивање било прихватљиво, примењују се следећи услови:

– укупно преживљавање оплођених јаја у контролним групама и где је релевантно, у посудама за испитивање пуњеним само растварачем, веће је или једнако границама дефинисаним у Делу трећем и четвртом ове методе;

– у току целог испитивања, концентрација растворeног кисеоника износи између 60% и 100% вредности засићења ваздуха (ASV);

– у току целог испитивања, температура воде у појединим коморама или узастопним данима ни у ком сату међусобно се не разликује за више од ± 1,5° C и креће се у температурном опсегу специфицираном за ту испитивану врсту (видети Део трећи и четврти ове методе).

1.6. ОПИС МЕТОДЕ

1.6.1. Коморе за испитивање

Може се користити било каква стаклена посуда или посуда од хемијски инертног материјала. Димензије посуда су довољно велике да испитивање буде изведено у складу са препорученим вредностима насада (видети одељак 1.7.1.2. ове методе). Посуде за испитивање распоређују се по принципу случајног распореда. Ако у лабораторији постоје системски ефекти који се могу контролисати блок системом, случајни распоред у блоковима (где је сваки третман смештен у по један блок) има предност над потпуно насумичним распоредом. Ако се ради у блоковима, систем се узима у обзир код анализе података. Испитиване коморе заштитити од нежељеног узнемиравања.

1.6.2. Избор врсте рибе

Препоручене врсте риба наведене су у Табели 1А. Могуће је коришћење других врста (примери су наведени у Табели 1Б), али се у том случају процедура модификује, да би се обезбедили задовољавајући испитивани услови. Ако се користе друге врсте дати објашњење за избор врсте и опис испитиване методе.

1.6.3. Одржавање лабораторијске популације риба

Детаљи о одржавању лабораторијске популације риба у задовољавајућим условима могу се наћи у Упутству за испитивање OECD TG 210[XIII] и литератури[2, 3, 4, 5, 6].

_____

XIII OECD, Paris, 1992, Test Guideline 210, „Fish, Early -life Stage Toxicity Test"

1.6.4. Поступање са ембрионима и ларвама

Унутар главне посуде за испитивање, ембриони и ларве могу бити изложени испитиваној супстанци у мањим посудама мрежастих зидова који омогућавају несметан проток испитиваног раствора кроз посуду. Уједначен проток кроз ове мале посуде може се постићи тако што се оне окаче о механичку руку, намештену тако да посуде помиче горе-доле, држећи организме непрекидно урођене у медијум. Може се употребити и сифонски систем. Оплођена јаја салмонидних риба могу бити подупрта на шипкама или мрежама чија су окца довољно велика да ларве, након што се излегу, могу да пропадну кроз њих. У семистатичким условима, у којима је обезбеђено свакодневно обнављање раствора, за уклањање ембриона и ларви прикладно је употребити Пастерове пипете (видети одељак 1.6.6. ове методе).

Када се за задржавање јаја унутар главне посуде користе решетке или мреже, оне се уклањају чим се ларве излегу, са изузетком мрежа које су и даље потребне за спречавање бежања ларви. Ако постоји потреба за премештањем ларви, оне не би смеле бити изложене ваздуху, нити се за пуштање рибе из посудица за јаја смеју користити мрежице (ова мера опреза може бити сувишна ако се ради о некој мање осетљивој врсти рибе, нпр. шарану). Погодан моменат за премештање ларви варира од врсте до врсте, а сам премештај није увек нужан. Ако се испитивање одвија у семистатичким условима, могу се користити лабораторијске чаше или плитке посуде, по потреби опремљене мрежицом подигнутом изнад дна посуде. Премештање ембриона или ларви није неопходно ако је запремина ових посуда довољна да задовољи постављене захтеве у погледу насада (видети одељак 1.7.1.2. ове методе).

1.6.5. Вода

Свака вода чија хемијска својства одговарају својствима прихватљиве воде за разблаживање, (наведено у Делу петом ове методе) и у којој јединке испитиване врсте у контролним групама преживљавају барем у мери како је описано у Делу трећем и четвртом ове методе, прикладна је за испитивање. Квалитет воде остаје непромењен у току целог испитивања. Вредност pH одржавати у опсегу од ± 0,5. Како би се осигурало да вода која се користи за разблаживање не утиче прекомерно на резултате испитивања (нпр. комплексирањем испитиване супстанце) или негативно не утиче на понашање матичног јата, узорке воде повремено анализирати. Ако се зна да се квалитет воде коришћене за разблаживање битно не мења, свака три месеца измерити концентрацију тешких метала (нпр. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd и Ni), главних анјона и катјона (нпр. Ca, Mg, Na, K, Cl и CO_4), пестицида (нпр. укупне органофосфорне и органохлорне пестициде), укупну концентрацију органског угљеника и у води суспендованих материја. Ако се покаже да је квалитет воде константан у току периода од најмање годину дана, анализе ових показатеља није потребно да буду тако честе, па се размаци између две анализе продужавају (на сваких шест месеци).

1.6.6. Раствори испитиване супстанце

Раствори испитиване супстанце изабране концентрације припремају се разблаживањем основног раствора.

Основни раствор се припрема тако што се испитивана супстанца једноставно механички промеша са водом за разблаживање или протресе у њој (мешањем и помоћу ултразвука). Одговарајућа концентрација основног раствора може се обезбедити употребом колона засићења (колона растворљивости). Употребу растварача или дисперзионих средстава (агенса који олакшавају растварање) избегавати кад год је могуће. Припремање основног раствора одговарајуће концентрације у неким случајевима изискује употребу ових једињења. У одговарајуће растваваче спадају: ацетон, етанол, метанол, диметилформамид и триетиленгликол. У одговарајућа

дисперзиона средства спадају: Cremophor RH40, Tween 80, метилцелулоза 0,01% и HCO-40. При употреби биоразградљивих агенаса (нпр. ацетона), односно лако испарљивих једињења потребно је предузети одређене мере опреза, јер код испитивања у проточним условима могу изазвати проблеме у смислу бактеријске надградње. Ако се користи средство које олакшава растворљивост, оно не сме имати никаквих значајних ефеката на преживљавање, нити видљивих нежељених ефеката на ране развојне облике риба контролне групе, изложене само растварачу.

Ако се испитивање обавља у полустатичном систему, обнављање испитиваног раствора може да се ради на два начина: испитивани раствор се припрема у чистим посудама, а преживела јаја и ларве у малој запремини старог раствора нежно премештају у нове посуде, избегавајући притом приступ ваздуха, или се испитивани организми задрже у посудама, а промени одређени део (најмање три четвртине) раствора. Учесталост обнављања медијума зависи од стабилности испитиване супстанце, али се препоручује да буде свакодневно. Ако се према резултатима скрининг теста (видети одељак 1.4. ове методе) покаже да концентрација испитиване супстанце у току периода између обнављања није стабилна (тј. излази из опсега од 80% до 120% номиналних вредности, односно пада испод 80% првобитно измерене концентрације), нужно је размотрити могућност испитивања у проточним условима. У току обнављања раствора пазити да се избегне стресогено дејство на ларве.

За испитивања која се изводе у проточним условима неопходан је систем који ће непрекидно распршивати и разблаживати основни раствор испитиване супстанце (нпр. мерна пумпа, пропорционални разблаживач, систем за засићење) како би испитивана супстанца стизала у испитиване коморе у серији концентрација. Током трајања испитивања, проток основног раствора и воде за разблаживање повремено проверити, ако је могуће свакодневно, а проток у току целог трајања испитивања не сме да варира за више од 10%. Као одговарајући показао се 24-сатни проток еквивалентан укупној запремини минимум пет комора[2] за испитивање.

1.7. ПРОЦЕДУРА

Корисни подаци о испитивању токсичности на ембрионима и ларвама су доступни у литератури[7, 8, 9].

1.7.1. Услови излагања

1.7.1.1. Трајање

Испитивање започети у првих 30 минута након оплодње јаја. Ембриони се у испитивани раствор урањају пре него што наступи цепање бластодиска, односно што пре након тога, али у сваком случају пре почетка стадијума гаструле. Ако се користе јаја набављена од комерцијалног добављача, може се догодити да са испитивањем није могуће започети одмах након оплодње. Како одлагање почетка испитивања може значајно да наруши осетљивост методе, испитивање започети најдаље осам сати од оплодње. Ларве се у току периода излагања не хране, па испитивање окончати непосредно пре него што жуманчана кеса било које ларве, у било којој од испитивања комора, буде у потпуности апсорбована, односно пре него што ларве у контролним групама угину од изгладнелости. Трајање испитивања зависи од врсте рибе. Неке препоручене дужине трајања испитивања наведене су у Делу трећем и четвртом ове методе.

1.7.1.2. Насад

На почетку испитивања број оплођених јаја задовољава статистичке захтеве. Јаја насумице распоредити између третмана. Свакој концентрацији испитиване супстанце изложити најмање 30 оплођених јаја, колико је могуће једнако расподељених у најмање три реплике (код неких врста риба тешко је добити једнаке серије). Насад (биомаса по запремини раствора) је довољно низак да се концентрација раствореног кисеоника може без аерације одржавати на минимум 60% ASV. Код испитивања у проточним условима, препоручује се да насад у 24 сата не прелази 0,5 g/l, односно да ни у ком тренутку не прелази 5 g/l раствора[2].

1.7.1.3. Осветљење и температура

Фотопериод и температура раствора су одговарајући за сваку испитивану врсту (видети Део трећи и четврти ове методе). За праћење температуре прикладна је употреба додатне посуде за испитивање.

1.7.2. Концентрације испитиване супстанце

Уобичајено је да се испитивање обавља у серији од пет концентрација испитиване супстанце у растућем низу, који се међусобно разликују за константно исти фактор, не већи од 3,2. При избору опсега испитиваних концентрација узети у обзир криву зависности LC_{50} и времена излагања, добијену испитивањем акутне токсичности. У неким случајевима, нпр. код испитивања намењених одређивању горње граничне концентрације, испитивање се обавља у мање од пет концентрација или у серији ужег опсега. Ако се испитивање обавља у мање од пет концентрација испитиване супстанце, наводи се објашњење. Концентрације супстанце које прелазе 96 h LC_{50}, односно 100 mg/l (зависно од тога која је од наведених вредности нижа) не испитују се. Супстанце не испитивати у концентрацијама које прелазе границу њихове растворљивости у медијуму.

Ако се за припрему испитиваног раствора користи средство које олакшава растварање (видети одељак 1.6.6. ове методе), његова крајња концентрација у свим посудама је једнака и не прелази 0,1 ml/l.

1.7.3. Контролне групе

Уз серију концентрација испитиване супстанце, поставити и једну контролну групу (у потребном броју понављања) у којој се налази само вода за разблаживање и уколико је у конкретном случају релевантно, једну (у потребном броју понављања) контролну групу у којој медијум садржи и средство за лакше растварање испитиване супстанце.

1.7.4. Учесталост аналитичких одређивања и мерења

Концентрације испитиване супстанце одређују се у правилним временским размацима, током испитивања.

Ако се испитивања изводе у полустатичким условима, у којима се очекује да ће се концентрација испитиване супстанце задржати унутар ± 20% номиналних вредности, односно у опсегу од 80% до 120% (видети одељке 1.4. и 1.6.6. ове методе), барем се три пута у правилним временским размацима анализирају узорци највише и најниже концентрације, тако што се прве анализе раде непосредно након припреме раствора, а затим и одмах након њиховог обнављања. Значи да је потребно анализирати узорак истог раствора – свеже припремљен и приликом обнављања.

У испитивањима код којих се на основу података о стабилности супстанце не очекује да ће се њена концентрација задржати унутар ± 20% номиналне вредности, неопходно је анализирати растворе свих концентрација непосредно након припреме и приликом њиховог обнављања, придржавајући се описаног режима контроле (анализа се обавља у најмање 3 наврата у правилним временским размацима). Концентрацију испитиване супстанце пре обнављања у сваком раствору неопходно је одредити у једној од реплика, у размаку не дужем од седам дана. Препоручује се да се резултати испитивања базирају на измереним концентрацијама. Али, ако постоје докази да се испитивана концентрација на задовољавајући начин одржава унутар ± 20% номиналне или измерене првобитне концентрације, резултати се могу базирати на номиналним или првобитно измереним вредностима.

Ако се испитивање изводи у проточним условима, прикладан је режим узимања узорка за анализу сличан режиму описаном за семистатичке услове (али у овом случају мерење „старих” раствора није примењиво). Ако испитивање траје дуже од седам дана, препоручљиво је да се повећа број узорака узетих у току прве недеље (обавити три серије мерења) да би се осигурало да испитиване концентрације и даље буду стабилне.

Некада је потребно узорке центрифугирати или филтрирати (помоћу 0,45 μм филтера). Али, ако ни у једном од два поменута начина припреме узорака није могуће раздвојити биодоступну фракцију испитиване супстанце од бионедоступне, узорци се не подвргавају овим поступцима.

Током испитивања, у свим посудама мерити растворени кисеоник, pH и температуру. У контролним посудама и посуди у којој је концентрација испитиване супстанце највиша, неопходно је измерити укупну тврдоћу раствора и салинитет, уколико је меродаван, најмање три пута (на почетку, средином и на крају испитивања). Ако се испитивање изводи у семистатичким условима, препоручује се да се растворени кисеоник мери чешће, ако је могуће пре и након сваког обнављања воде, односно минимум једном недељно. При испитивању у условима статичког обнављања, pH вредност мерити на почетку и на крају сваког обнављања воде, а при испитивању у проточним условима најмање једном недељно. Тврдоћу раствора измерити једном у току испитивања. Температуру мерити свакодневно, а препоручљиво је да се у најмање једној од посуда прати непрекидно.

1.7.5. Запажања

1.7.5.1. Развојни стадијум ембриона

На почетку излагања испитиваној супстанци, ембрионални стадијум (тј. стадијум гаструле) потврдити што је прецизније могуће. То се постиже помоћу репрезентативног узорка, адекватно сачуваних и очишћених јаја. Опис и илустрације развојних стадијума дати су у литератури[2, 5, 10, 11].

1.7.5.2. Изваљивање из јаја и преживљавање

Запажања која се односе на изваљивање из јаја и преживљавање, записују се најмање једном дневно. На почетку испитивања пожељно је да се запажања обаве и чешће (у току прва три сата на сваких 30 минута), јер у неким случајевима (нпр. када се јављају акутни токсични ефекти), времена преживљавања могу бити од веће важности него број угинулих примерака. Угинуле ембрионе и ларве уклонити одмах по опажању, јер се могу врло брзо распасти. При одстрањивању угинулих примерака, посебну пажњу посветити томе да се не ударе или физички оштете јаја/ларве у непосредној близини, које су посебно нежне и осетљиве. Критеријуми за проглашавање смрти варирају у зависности од стадијума животног циклуса:

– за јаја – приметан губитак прозирности и промена боје узроковани згрушавањем, односно преципитацијом беланчевина, што условљава бео, непрозиран изглед, нарочито у раним развојним стадијумима;

– за ембрионе – одсуство кретњи тела и/или пулса, односно промена боје и непрозиран изглед врста чији су ембриони у редовним околностима прозирни;

– за ларве – непокретност и/или одсуство покретадисања и/или одсуство пулса и/или бело непрозирно обојен централни нервни систем и/или изостанак реакције на механички надражај.

1.7.5.3. Патолошки изглед

Број ларви патолошког облика тела, односно боје, као и стадијум апсорпције у ком се налази жуманчана кеса, бележити у адекватним временским размацима зависно од дужине испитивања и природе патолошке промене која се описује. Патолошки облици ембриона и ларви јављају се и природно, а њихова заступљеност у контролној групи (групама) неких врста може бити реда величине неколико процената. Животиње патолошких обележја из посуде за испитивање уклонити тек кад угину.

1.7.5.4. Патолошко понашање

Патолошке промене, нпр. хипервентилацију, некоординисано пливање и атипично мировање, забележити у адекватним временским размацима у зависности од дужине испитивања. Иако их је тешко квантификовати, ови ефекти када се опазе могу помоћи у тумачењу резултата смртности, тј. дати податке о начину токсичног дејства испитиване супстанце.

1.7.5.5. Дужина

На крају испитивања, препоручљиво је измерити дужину сваке јединке. Могуће је мерити стандардну, попречну или укупну дужину. Ако репно пераје иструне или еродира, измерити стандардну дужину. У добро спроведеном испитивању, коефицијент варијације дужине реплика углавном износи ± 20%.

1.7.5.6. Тежина

На крају испитивања измерити тежину сваке јединке. Предност се даје сувој маси (риба сушена 24 сата на температури од 60° C) у односу на свежу (површина рибљег тела осуши се упијањем). У добро обављеном испитивању, коефицијент варијације тежине реплика износи ± 20%.

Ова запажања ће резултирати неким или свим наведеним подацима који се могу анализирати статистички:

– кумулативна смртност;

– број здравих ларви у појединој реплици забележен на крају испитивања;

– време протекло до почетка, односно до окончања изваљивања (тј. време које је у свакој реплици било потребно да се излегне 90% ларви);

– број ларви који се дневно извалио;

– дужина (и тежина) преживелих животиња на крају испитивања;

– број ларви патолошког облика или изгледа;

– број ларви патолошког понашања.

2. ПОДАЦИ И ИЗВЕШТАЈ

2.1. ОБРАДА РЕЗУЛТАТА

Препоручује се да у испитивану поставку и анализу буде укључен статистичар, јер ова метода омогућава знатне варијације у испитиваној поставци, нпр. у броју употребљених испитиваних посуда, броју испитиваних концентрација, почетном броју оплођених јаја и мерним показатељима. С обзиром на број опција које при поставци ове методе испитивања стоје на располагању, овде нису наведене специфичне смернице за статистичку обраду резултата.

Ако је потребно одредити LOEC/NOEC, неопходно је анализирати варијације унутар сваког од сетова реплика, и то употребом анализе варијанце (ANOVA) или поступцима који користе таблице контингенције. При вишеструком поређењу резултата добијених при излагању појединим концентрацијама испитиване супстанце и резултата добијених у контролним групама, може бити корисна Дунетова метода[12, 13]. На располагању су и друге корисне методе[14, 15]. Величина ефекта која се детектује помоћу ANOVA или других поступака статистичке обраде (тј. статистичка снага), израчунава се и наводи. За статистичку анализу путем ANOVA нису прикладна сва запажања наведена у одељку 1.7.5.6. ове методе. На пример, кумулативна смртност и број здравих ларви у појединој реплици, забележени на крају испитивања, анализирају се пробит методама.

Ако се одређује LC/EC_x, адекватну криву (као што је логистичка) прилагодити значајним подацима користећи статистичке методе попут метода најмањих квадрата или метода нелинеарних најмањих квадрата. Криву (криве) параметарски прилагодити на начин да се LC/EC_x од интереса и њена стандардна грешка могу директно утврдити. Ово ће значајно олакшати израчунавање интервала поверења око вредности LC/EC_x. Ако не постоје добри разлози за давање предности другачијим нивоима поверења, интервал поверења који је потребно навести је двострани 95%-ни. Поступак прилагођавања криве осигурати на начин на који ће се проценити статистички значај неприлагођености. За прилагођавање кривих користити графичке методе. Регресиона анализа је погодна за анализу свих запажања набројених у одељку 1.7.5.6. ове методе.

2.2. ТУМАЧЕЊЕ РЕЗУЛТАТА

Када се измерене концентрације испитиване супстанце налазе у концентрацијама блиским граници детекције аналитичке методе, резултате тумачити опрезно. Треба пазити и код тумачења резултата добијених при излагању испитиваних модела концентрацијама које прелазе растворљивост испитиване супстанце у води.

2.3. ИЗВЕШТАЈ

Извештај о испитивању садржи податке о:

1) испитиваној супстанци:

– физичка природа и релевантна физичка и хемијска својства;

– подаци од значаја за хемијску идентификацију супстанце као што су њена хемијска чистоћа и где је примерено, аналитичка метода којом се може квантификовати испитивана супстанца.

2) испитиваној врсти:

– латински назив, сој, број родитељских јединки риба (тј. колико је женки употребљено да би се у свакој од реплика обезбедио потребан број јаја), извор и метода сакупљања оплођених јаја, као и руковање њима.

3) условима испитивања:

– примењена процедура испитивања (нпр. полустатични или проточни систем, време протекло од оплодње до почетка испитивања, насад, итд);

– фотопериод;

– испитивана поставка (нпр. број испитиваних посуда и реплика, број ембриона у свакој од реплика);

– метода припреме основних раствора и учесталост њиховог обнављања (концентрација растварача ако се користи);

– номиналне концентрације испитиване супстанце, измерене вредности, њихове аритметичке средине и стандардна девијација, метода којом су добијене, и уколико је испитивана супстанца у води растворљива у концентрацијама нижим од испитиваних докази да се мерења односе на концентрације испитиване супстанце у раствору;

– карактеристике воде за разблаживање (pH, тврдоћа, температура, концентрација раствореног кисеоника, нивои резидуалног хлора, уколико су измерени, укупни органски угљеник, концентрација суспендованих материја, салинитет

испитиваног медијума, уколико је измерен) и резултати било којих других мерења;

– квалитет воде у посудама за испитивање (pH, тврдоћа, температура и концентрација растворeног кисеоника);

4) резултатима:

– резултати свих претходно обављених студија о стабилности испитиване супстанце;

– докази да је стопа преживљавања у контролним групама задовољила стандард прихватљивости за испитивану врсту (видети Део трећи и четврти ове методе);

– подаци о смртности/преживљавању у ембрионалном и ларвалном стадијуму, и укупна смртност/укупно преживљавање;

– број дана до изваљивања и број изваљених ларви;

– подаци о дужини (и тежини);

– учесталост и опис патолошких морфолошких облика, ако их је било;

– учесталост и опис ефеката испитиване супстанце на понашање испитиваног модела, уколико је таквих било;

– статистичка анализа и обрада података;

– за испитивања чији су резултати анализирани помоћу ANOVA, за сваки од утврђених одговора испитиваног модела на излагање испитиваној супстанци, најнижа концентрација испитиване супстанце при којој се на нивоу значаја од p = 0,05 јавља LOEC, односно не јавља статистички значајан ефекат NOEC, укључујући и опис примењених статистичких поступака и назнаку величине ефекта који се могао детектовати;

– ако су резултати испитивања анализирани регресионим техникама, $LC/EC_н$ и интервали поверења као и графички приказ прилагођеног модела коришћеног при израчунавању;

– објашњење било каквог одступања од ове методе испитивања.

3. ЛИТЕРАТУРА

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, p. 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. p. 26

3. Brauhn J.L. and Schoettger R.A., (1975) Acquisition and Culture of Research Fish: Rainbow trout, Fathead minnows, Channel Catfish and Bluegills. p. 54, Ecological Research Series, EPA-660/3-75-011, Duluth, Minnesota.

4. Brungs W.A. and Jones B.R., (1977) Temperature Criteria for Freshwater Fish: Protocol and Procedures p. 128, Ecological Research Series EPA-600/3-77-061, Duluth, Minnesota.

5. Laale H.W., (1977) The Biology and Use of the Zebrafish (*Brachydanio rerio*) in Fisheries Research. A Literature Review. J. Biol. 10, p. 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, p. 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, p. 61-71.

8. Birge J.W., Black J.A. and Westerman A.G., (1985) Short-term Fish and Amphibian Embryo-larval Tests for Determining the Effects of Toxicant Stress on Early Life Stages and Estimating Chronic Values for Single Compounds and Complex Effluents. Environmental Toxicology and Chemistry 4, p. 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, p. 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. p. 36.

12. Dunnett C.W., (1955) A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with 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. 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, p. 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, p. 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, p. 126-134.

18. Meyer A., Bierman C.H. and Orti G., (1993) The phylogenetic position of the Zebrafish (Danio rerio), a model system in developmental biology – an invitation to the comperative methods. Proc. Royal Society of London, Series B, 252: 231-236.

19. Ghillebaert F., Chaillou C., Deschamps F. and Roubaud P., (1995) Toxic Effects, at Three pH Levels, of Two Reference Molecules on Common Carp Embryo. Ecotoxicology and Environmental Safety 32, p. 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, p. 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, p. 280.

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, p. 1-58.

Табела 1а: Препоручене врсте риба за методу испитивања

СЛАТКОВОДНЕ
Oncorhynchus mykiss[9, 16] (пастрмка)
Danio rerio[7, 17, 18] (зебрица)
Cyprinus caprio[8, 19](шаран)
Oryzias latipes[20, 21]
Pimephales promelas[8, 22]

Табела 1б: Остале добро проучене врсте које се могу користити

СЛАТКОВОДНЕ	МОРСКЕ
Carassius auratus (сребрни караш/ бабушка)	*Menidia peninsulae*[23, 24, 25] *Clupea harengus*[5] (харинга)
Lepomis macrochirus[8] (сунчаница)	*Gadus morhua*[24, 25] (бакалар)
	Cyprinodon variegatus[23, 24, 25] (бјелица)

Део други

УПУТСТВО ЗА ИСПИТИВАЊЕ ТОКСИЧНОСТИ НА ЕМБРИОНИМА И ЛАРВАМА *Brachydanio rerio* (зебрица)

УВОД

Зебрица потиче са индијске обале (Коромандел), где насељава брзаке. Реч је о обичној акваријумској риби из породице шарана, а подаци о поступцима држања и узгоја могу се наћи у стандардним приручницима о тропским рибама. Биологија ове рибе и њена употреба у истраживањима из домена рибарства, дата је у литератури[1].

Примерци ове рибе ретко су дужи од 45 mm. Тело им је цилиндричног облика, са 7 до 9 тамноплавих уздужних сребрнкастих пруга које се протежу до репног и аналног пераја. Дорзална страна им је маслинастозелене боје. Мужјаци су виткији од женки. Женке су сребрнкастије, а абдомен им је растегнут, нарочито пре мреста.

Одрасле рибе подносе велике флуктуације температуре, pH и тврдоће воде. Међутим, да би се добила здрава риба која

производи квалитетна јаја, потребно је обезбедити оптималне услове.

Током мреста, мужјак прати женку и насрће на њу, а јаја буду оплођена чим се избаце. Јаја, која су прозирна и нељепљива, падају на дно, на ком их родитељи могу појести. На мрест утиче светлост. Уколико је јутарње светло адекватно, риба се мрести у раним јутарњим сатима, у зору.

Женка у размаку од по недељу дана може произвести серије од неколико стотина јаја.

УСЛОВИ КОЈЕ ТРЕБА ОБЕЗБЕДИТИ РОДИТЕЉСКОЈ ПОПУЛАЦИЈИ, РЕПРОДУКЦИЈА И РАНИ РАЗВОЈНИ СТАДИЈУМИ

Изабере се одговарајући број здравих јединки и држе се у одговарајућој води (видети Део пети ове методе) најмање 2 недеље пре мреста. Групи риба дозволити да се размножава најмање једном пре него што ће се јаја користити у испитивању. Густина популације у току овог периода не прелази 1 грам рибе по литри. Редовна измена воде или употреба система за пречишћавање воде обезбеђује већу густину. Температуру у акваријумима одржавати на (25 ± 2)° C. Рибама давати разноврсну исхрану која се може састојати од погодне комерцијалне суве хране, живих новоизлеглих ларви артемија, хирономида, дафнија, енхитрада.

Поступци који су у пракси обезбеђивали серије здравих, оплођених јаја, која су коришћена за испитивања су:

У комору за испитивање са 50 L воде за разблаживање смешта се осамженки и 16 мужјака, заштити од директног светла и остави да уз што мање ометања тамо бораве најмање 48 сати. Дан пре почетка испитивања на дно коморе се у послеподневним сатима поставља посуда за мрест. Посуда се састоји од оквира (од плексигласа или неког другог прикладног материјала), висине 5 cm до 7 cm, на чији је врх причвршћена груба мрежица промераокаца 2 mmдо5 mm, а на дно се причврсти фина мрежица окаца од 10 µm до 30 µm. На грубу мрежицу смештену на оквир причврсти се „дрвеће за мрест" направљено од расплетеног најлонског ужета. Након што се риба 12 сати остави у мраку, упали се пригушено светло које стимулише мрест. Два до четири сата након мреста, посуда за мрест се склони и покупе се јаја. Посуда за мрест спречава рибе да поједу јаја, а истовремено омогућава да се она лако сакупе. Пре мреста из којег ће се јаја користити у испитивањима, родитељска група риба има најмање један мрест из кога се јаја не користе у испитивању.

Најмање две недеље пре планираног мреста, 5 до 10 мужјака и женки држе се појединачно. Након 5 до 10 дана, трбуси женки се растежу, а њихове гениталне папиле постају видљиве. Мужјаци немају папиле. Мрест се обавља у за то намењеним коморама, опремљеним лажно-мрежастим дном (како је описано). Комора се напуни водом за разблаживање, тако да висина воденог стуба изнад мрежице износи 5 cm до 10 cm. Дан пре планираног мреста, у комору се смешта једна женка и два мужјака. Температура воде се поступно повећава до вредности која је за један степен виша од температуре на коју су се рибе аклиматизовале. Комора се остави у мраку, без узнемиравања. Ујутро се упали пригушено светло, што стимулише мрест. Након 2 до 4 сата рибе се уклоне, а јаја покупе. Ако постоји потреба за серијама јаја већим од оних које се могу добити од једне женке, истовремено се може поставити већи број таквих комора. Бележењем успешности репродукције појединих женки пре почетка испитивања (величине и квалитета серије њихових јаја), за приплод се могу одабрати женке чија је репродукција најуспешнија.

Јаја се у посуде за испитивање преносе помоћу стаклених пипета (унутрашњег промера не мањег од 4 mm), које имају гумену пумпицу. Количина воде у којој се јаја преносе је што је могуће мања. Јаја су тежа од воде па лако исцуре из цевчице. Потребно је предузети мере којима се спречава да јаја (и ларве) дођу у додир са ваздухом. Узорци серија се прегледају микроскопски, како би се уверило да у почетним развојним стадијумима нема неправилности. Дезинфекција јаја није дозвољена.

Стопа смртности јаја највиша је у прва 24 сата након оплодње. Током овог раздобља често се уочава стопа смртности од 5% до 40%. Јаја дегенеришу због неуспешне оплодње или развојних мана. Чини се да квалитет серије јаја зависи од женке, јер док неке женке доследно производе квалитетна јаја, код других се то никада неће догодити. Брзина развоја и изваљивања ларви варира од серије до серије. Стопа преживљавања успешно оплођених јаја и ларви је висока, обично изнад 90%. При температури од 25° C ларве се изваљују из јаја 3 до 5 дана након оплодње, а жуманчана кеса се апсорбује отприлике 13 дана након оплодње.

Добро је истражен ембрионални развој[2]. Због прозирности јаја и ларви које су се из њих извалиле, прати се развој јединки и уочавају патолошки развојни облици. Отприлике четири сата након мреста, неоплођена јаја могу се разликовати од оплођених[3]. Да би се извршило овај преглед, јаја и ларве се стављају у посуде мале запремине и прегледају под микроскопом.

Услови под којим се обавља испитивање раних развојних облика набројани су у Делу трећем ове методе. Оптимална тврдоћа воде која се користи за разблаживање је 250 mg $CaCO_3$/l, а pH вредност 7,8.

ИЗРАЧУНАВАЊЕ И СТАТИСТИКА

Предлаже се двостепени приступ. Прво се статистички анализирају подаци о смртности, патолошком развоју и времену потребном да се ларве извале. Затим се, код риба изложених концентрацијама испитиване супстанце при којима нису уочени никакви нежељени ефекти ни на један од ових показатеља, статистички вреднује дужина тела. Ово је препоручљив приступ јер токсична супстанца може селективно летално да делује на мање јединке, одложи време изваљивања и изазове макроскопски видљиве патолошке облике, доводећи до одступања при мерењу дужине тела. При свакој концентрацији мери се у грубо исти број јединки, чиме се обезбеђује ваљаност статистичке обраде резултата испитивања.

ОДРЕЂИВАЊЕ LC_{50} И EC_{50}

Проценат преживелих ембриона и ларви рачуна се и коригује у односу на смртност забележену у контролним групама, у складу са Аботовом једначином[4]:

$$P = 100 - \left(\frac{C - P'}{C} \times 100 \right)$$

при чему:

P јесте кориговани проценат преживљавања;

P ' јесте проценат преживљавања уочен при тест концентрацији;

C јесте проценат преживљавања у контролним групама.

Ако постоји могућност, LC_{50} се одређује прикладном методом на крају испитивања.

Ако је у статистичку анализу EC_{50} потребно укључити и морфолошке абнормалности, смернице и упутство дати су у литератури[5].

ОДРЕЂИВАЊЕ LOEC И NOEC

Циљ испитивања токсичности на ембрионима и ларвама је поређење деловања концентрација испитиване супстанце већих од нуле са контролним групама, односно циљ методе је одредити LOEC. Због тога применити поступке вишеструког поређења[6, 7, 8, 9, 10].

ЛИТЕРАТУРА

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 Zebrabärbling (Brachydanio rerioHamilton-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 andMaterials, 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 witha 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.

Део трећи

Услови испитивања, трајање испитивања и критеријуми оцене преживљавања за врсте које су препоручене за ову методу испитивања

врсте	температура (°c)	салинитет (0/00)	фотопериод (сати)	дужина трајања стадијума (дани)		типична дужина испитивања	преживљавање у контролним групама, (минимум %)	
				ембриони	ларве		успешно изваљивање	после изваљивања
Слатководне								
Brachydanio rerio (зебрица)	25 ± 1	–	12-16	3-5	8-10	одмах по оплодњи (рана фаза гаструле) до 5 дана после изваљивања (8 до 10 дана)	80	90

Oncorhynchus mykiss (пастрмка)	10 ± 1[XIV] 12 ± 1[XV]	–	0[XVI]	30-35	25-30	одмах по оплодњи (рана фаза гаструле) до 20 дана после изваљивања (50 до 55 дана)	66	70
Cyprinus carpio (шаран)	21 – 25	–	12-16	5	> 4	одмах по оплодњи (рана фаза гаструле) до 4 дана после изваљивања (8 до 9 дана)	80	75
Oryzias latipes	24 ± 1[XV] 23 ± 1[XVI]	–	12-16	8-11	4-8	одмах по оплодњи (рана фаза гаструле) до 5 дана после изваљивања (13 до 16 дана)	80	80
Pimephales promelas	25 ± 2	–	16	4-5	5	одмах по оплодњи (рана фаза гаструле) до 4 дана после изваљивања(8 до 9 дана)	60	70

––––––––––––––

XIV За ембрионе

XV За ларве

XVI Ембриони и ларве до једне недеље након изваљивања држе се у мраку, осим када се прегледају. Од тада се примењује режим смањеног осветљења.

Део четврти

Услови под којима се врши испитивање, дужина испитивања и критеријуми оцене преживљавања за друге добро проучене врсте

врсте	температура (°c)	салинитет (0/00)	фотопериод (сати)	дужина трајања стадијума (дани)		типична дужина испитивања	преживљавање у контролним групама (минимум %)	
				ембриони	ларве		успешно изваљивање	после изваљивања
слатководне								
Carassius auratu	24 ± 1	–	–	3-4	> 4	одмах по оплодњи (рана фаза гаструле) до 4 дана после изваљивања (7 дана)	–	80
Leopomis macrochirus	21 ± 1	–	16	3	> 4	одмах по оплодњи (рана фаза гаструле) до 4 дана после изваљивања (7 дана)	–	75
морске								
Menidia peninsulae	22-25	15-22	12	1,5	> 4	одмах по оплодњи (рана фаза гаструле) до 5 дана после изваљивања (6 до 7 дана)	80	60
Clupea harengus	10 ± 1	8-15	12	20-25	4-8	одмах по оплодњи (рана фаза гаструле) до 3 дана после изваљивања (23 до 27 дана)	60	80
Gadus morhua	5 ± 1	5-30	12	14-16	5	одмах по оплодњи (рана фаза гаструле) до 3 дана после изваљивања(18 дана)	60	80
Cyprinodon variegatus	25 ± 1	15-30	12	–	–	одмах по оплодњи (рана фаза гаструле) до 4/7 дана после изваљивања(28 дана)	> 75	80

Део пети

Хемијска својства воде прихватљиве за разблаживање

СУПСТАНЦА	КОНЦЕНТРАЦИЈЕ
Честице	< 20 mg/l
Укупни органски угљеник	< 2 mg/l
Нејонизовани амонијак	< 1 mg/l
Резидуални хлор	< 10 mg/l
Укупни органофосфорни пестициди	< 50 ng/l
Укупни органохлорни пестициди и полихлоровани бифенили	< 50 ng/l
Укупни органски хлор	< 25 ng/l

C.16. ПЧЕЛЕ – ИСПИТИВАЊЕ АКУТНЕ ОРАЛНЕ ТОКСИЧНОСТИ

1. МЕТОДА ИСПИТИВАЊА

Метода се заснива на Упутству за испитивање OECD 213 (1998).

1.1. УВОД

Ова метода испитивања токсичности јесте лабораторијска метода дизајнирана за процену акутне оралне токсичности средстава за заштиту биља и других хемикалија на одрасле пчеле – радилице.

Поступак процене и вредновања токсичних својстава супстанци може захтевати утврђивање акутне оралне токсичности код пчела, нпр. у случајевима када је вероватно да ће пчеле бити изложене датој хемикалији. Испитивање акутне оралне токсичности изводи се да би се утврдила својствена токсичност пестицида и других хемикалија на пчеле. Резултати овог испитивања користе се за утврђивање потребе за даљим вредновањем. Метода је посебно погодна код етапних програма за процену хазарда који пестициди представљају за пчеле, на основу хијерархијског редоследа, од лабораторијских испитивања токсичности, до полутеренских и теренских испитивања[1]. Пестициди се могу испитивати као активне супстанце (у даљем тексту: а.с) или као формулисани производи.

Осетљивост пчела и прецизност поступка испитивања потврдити применом стандардних токсичних супстанци.

1.2. ДЕФИНИЦИЈЕ

Акутна орална токсичност јесу штетне последице које се јављају најкасније 96 сати након оралне примене једнократне дозе испитиване супстанце.

Доза јесте количина конзумиране испитиване супстанце и изражава се као маса (mg) испитиване супстанце по јединки (mg/пчела). Права доза за сваку пчелу не може се израчунати с обзиром на то да се пчеле хране колективно, али се може израчунати просечна доза (у потпуности конзумирана испитивана супстанца по броју јединки – пчела у једном кавезу).

Орална LD50 (средња летална доза) јесте статистички изведена једнократна доза супстанце која може изазвати смрт 50% животиња кад се примењује орално. Вредност LD_{50} изражава се у (mg) испитиване супстанце по пчели. Ако се испитује дејство пестицида, испитивана супстанца може бити активна супстанца или формулисани производ који садржи једну или више активних супстанци.

Смртност јесте случај када је јединка потпуно непомична и сматра се угинулом.

1.3. ПРИНЦИП МЕТОДЕ

Одрасле пчеле радилице (*Apis melifera*) излажу се серији доза испитиване супстанце, распршене у раствору сахарозе. Пчелама се након примене једнократне дозе даје иста храна, али без испитиване супстанце. Смртност се бележи свакодневно у току најмање 48 сати и пореди са контролним вредностима. Уколико између 24 и 48 сата стопа смртности расте, док у контролној групи и даље остаје на прихватљивом нивоу, односно < 10%, примерено је продужити трајање испитивања до највише 96 сати. Резултати испитивања се анализирају да би се израчунала вредност LD_{50} након 24 и 48 сати, а у случају да је испитивање продужено и након 72 и 96 сати.

1.4. КРИТЕРИЈУМИ ПРИХВАТЉИВОСТи ИСПИТИВАЊА

Да би испитивање било прихваћено, испуњавају се услови:

– просечна смртност за укупни број контролних група не прелази 10% на крају испитивања;

– LD_{50} стандарда токсичности се налази у одређеном опсегу.

1.5. ОПИС МЕТОДЕ

1.5.1. Сакупљање пчела

Користе се младе одрасле пчеле радилице истог рода, односно пчеле једнаке старости, стања ухрањености итд. Пчеле

набавити из адекватно храњених, здравих колонија, без забележених болести, колико је могуће, устројених по хијерархијском принципу матице, познатог педигреа и физиолошког статуса. Могу се сакупити оног јутра када се планира почетак испитивања или претходно вече, па их до сутрадан држати у експерименталним условима. Прикладне су пчеле сакупљене са оквира на којима нема јаја. Сакупљање пчела у рано пролеће или касну јесен избегавати, јер је њихова физиологија у то време промењена. Ако се испитивање изводи у рано пролеће или касну јесен, пчеле се могу излећи у инкубатору и отхранити недељу дана „пчелињим хлебом" (поленом сакупљеним из сећа) и раствором сахарозе. Пчеле третиране хемијским супстанцама (антибиотици, производи за уништавање *Varroa* гриња) није дозвољено користити за испитивање токсичности четири недеље након завршетка последњег третмана.

1.5.2. Услови смештаја и исхране

Користе се кавези који се лако чисте и добро проветравају. Могу бити од било ког прикладног материјала, нпр. нерђајућег челика, жичане мреже, пластике, а могу се користити и дрвени кавези за једнократну употребу итд. Препоручују се групе од 10 пчела по кавезу. Величина кавеза је примерена броју пчела, како би им се пружио одговарајући простор.

Пчеле држати у тамној лабораторији на температури од 25° C ± 2° C. Релативну влажност, која уобичајено износи око 50% до 70%, бележити у току трајања целог испитивања. Поступци руковања, укључујући третман и бележење запажања, обављају се на дневном светлу. Као храна користи се водени раствор сахарозе, крајње концентрације од 500 g/l (50% односа тежине и запремине, w/в). Након што су дате дозе, храну давати неограничено (*ad libitum*). Систем храњења омогућава праћење уноса хране за сваки кавез (видети одељак 1.6.3.1. ове методе). Користи се и стаклена цевчица (дужине око 50 mm, ширине 10 mm, са отвореним крајем који се сужава до промера од око 2 mm).

1.5.3. Припрема пчела

Пчеле сакупљене случајним распоредом смештају се у кавезе који се налазе у лабораторији, такође по случајном распореду. Пчеле се могу изгладнети до 2 сата пре почетка испитивања. Препоручује се да се пчеле не хране пре третмана да би на почетку испитивања свим јединкама цревни садржај био исти. Пчеле на умору пре почетка испитивања одбацити и заменити их здравим.

1.5.4. Припрема доза

Ако испитивана супстанца спада у једињења која се могу мешати са водом, може се директно распршити у 50%-ни раствор сахарозе. Ако су у питању комерцијални производ и супстанце слабо растворљиве у води, могу се употребити носачи као што су органски растварачи, емулгатори или дисперзиона средства ниске токсичности за пчеле (нпр. ацетон, диметилформамид, диметилсулфоксид). Концентрација носача зависи од растворљивости испитиване супстанце и у свим групама, у свим концентрацијама је иста. Сматра се да је одговарајућа концентрација носача 1% и не прекорачује се.

Припремити адекватне контролне растворе који садрже носач (растварач или дисперзионо средство). Користе се две одвојене контролне групе са воденим раствором и са раствором сахарозе у коју је додат носач и то у концентрацији примењеној у испитиваним растворима.

1.6. ПОСТУПАК

1.6.1. Испитиване и контролне групе

Број доза и број понављања задовољава статистичке захтеве у погледу одређивања LD_{50} у интервалима поверења од 95%. Обично се испитивање ради са 5 доза у геометријској серији, са фактором не већим од 2,2 тако да буде обухваћен опсег потребан за одређивање LD_{50}. Фактор разблажења и број концентрација за дозирање одредити према нагибу криве токсичности (доза према смртности), водећи рачуна о захтевима статистичке методе одабране за анализу резултата. Прелиминарна студија у циљу утврђивања опсега концентрација омогућује правилан избор испитиваних концентрација.

Најмање три групе по 10 пчела у сваком кавезу изложити свакој испитиваној дози. У сваком испитивању обезбедити најмање три контролне групе са по 10 пчела по кавезу. Укључити и додатне контролне групе ако се користе носачи (видети одељак 1.5.4. ове методе).

1.6.2. Стандард токсичности

У испитиване серије укључити и студија токсичности стандарда. Да би се обухватила очекивана вредност LD_{50}, потребно је одабрати најмање три дозе стандардна. Најмање три групе по 10 пчела у сваком кавезу изложити свакој дози стандарда. Као стандард токсичности обично се користи диметоат, чија се LD_{50} након 24 сата пероралне примене креће у опсегу од 0,10 mg до 0,35 mg a.c./пчели[2]. Прихватљиви су и други стандарди токсичности, под условом да се располаже довољном количином података о очекиваној дозној зависности (нпр. паратион).

1.6.3. Излагање

1.6.3.1. Примена доза

Свакој од испитиваних група пчела обезбедити 100 ml до 200 ml 50%-ног воденог раствора сахарозе који садржи одређену концентрацију испитиване супстанце. Ако се испитују слабо растворљива, нетоксична или једињења која се у комерцијалном производу налазе у ниским концентрацијама, применити већу запремину, јер је потребно да њихов удео у раствору сахарозе буде већи. Пратити количину третиране хране коју је конзумирала свака од испитиваних група. Када испитиване јединке поједу третирану храну (обично у току 3 до 4 сата), хранилицу уклонити из кавеза и заменити је другом која садржи само раствор сахарозе. Раствор сахарозе пчелама се ставља на располагање *ad libitum*. Код неких једињења у вишим концентрацијама, пчеле третирану храну могу одбијати, што доводи до тога да поједу мало хране или је не поједу

уопште. Након највише 6 сати хранилицу са остацима третиране хране заменити нетретираном раствором сахарозе. Проценити колико је третиране хране конзумирано (нпр. мерењем односа запремине или масе остатака третиране хране).

1.6.3.2. Дужина испитивања

Препоручује се да, након што се испитивани раствор замени нетретираним раствором сахарозе, испитивање траје 48 сати. Ако се региструје раст смртности након прва 24 сата за више од 10%, испитивање продужити до највише 96 сати, под условом да смртност у контролним групама не прелази 10%.

1.6.4. Запажања

Смртност се бележи 4 сата након почетка испитивања, затим након 24 сата и 48 сати (након примене дозе). Уколико се укаже потреба да се испитивање продужи, даље процене вршити у 24-сатним интервалима, најдуже до укупно 96 сати, под условом да смртност у контролним групама не прелази 10%.

Потребно је утврдити количину хране коју је свака група пчела конзумирала. Поређење брзине конзумације третиране и нетретиране хране унутар одређеног шестосатног раздобља може дати податке о укусу третиране хране.

Потребно је забележити све појаве неуобичајеног понашања током испитивања.

1.6.5. Гранична студија

У неким случајевима (нпр. када се очекује да је испитивана супстанца нетоксична) може да се постави гранична студија, употребом 100 mg а.с./пчели, да би се показало да LD_{50} прелази ову вредност. Треба користити исти поступак, укључујући три испитиване групе (реплике) које ће се изложити дози, релевантне контролне групе, процену конзумиране количине третиране хране и употребу стандарда токсичности. Уколико дође до угинућа пчела, испитивање је неопходно извести у целости, забележе се и сублетални ефекти (видети одељак 1.6.4. ове методе).

2. ПОДАЦИ И ИЗВЕШТАЈ

2.1. ПОДАЦИ

Подаци се приказују у табеларној форми. За сваку испитивану групу, било да је у питању контролна или група стандардне токсичности, наводи се број испитиваних јединки, смртност у сваком изабраном тренутку опажања, као број пчела са нежељеним променама у понашању. Подаци о смртности се анализирају погодним статистичким методама (нпр. пробит-анализом, лутајућом средњом вредношћу, биномном вероватноћом)[3, 4]. Потребно је графички приказати криве дозне зависности за сваки препоручени сат посматрања, израчунати нагиб криве и средњу леталну дозу (LD_{50}) са 95% интервалом поверења. Исправке везане за смртност у контролној групи се могу урадити помоћу Аботове корекције[4, 5]. Ако третирана храна није у потпуности конзумирана, потребно је одредити дозу испитиване супстанце коју је заиста конзумирала свака група. LD_{50} изразити у mg испитиване супстанце по пчели.

2.2. ИЗВЕШТАЈ

Извештај о испитивању садржи податке о:

1. испитиваној супстанци:

– физичка својства и релевантна физичка и хемијска својства (нпр. постојаност у води, напон паре);

– подаци од значаја за хемијску идентификацију супстанце, укључујући структурну формулу, чистоћу (нпр. ако се ради о пестицидима, генерички назив и концентрацију активних супстанци).

2. испитиваној врсти:

– латински назив, род, приближна старост (у недељама), метода прикупљања, датум прикупљања;

– подаци о колонијама из којих су сакупљене пчеле, укључујући здравствено стање у тим колонијама, постојање било какве болести одраслих примерака, било какав претходни третман, итд.

3. условима у току испитивања:

– температура и релативна влажност у лабораторији;

– услови смештаја испитиваних јединки, укључујући врсту, величину кавеза и материјал од којег су направљени;

– методе припреме основног и испитиваних раствора (уколико се користи носач, навести врсту и концентрацију);

– поставка испитивања, нпр. број коришћених концентрација и број контрола (број кавеза репликата и број пчела по кавезу за сваку концентрацију и контролу);

– датум испитивања.

4. резултатима:

– резултати прелиминарног испитивања за одређивање опсега доза, ако је рађено;

– необрађени подаци – смртност у свакој од испитиваних концентрација, у сваком сату опажања;

– графички приказ криве дозне зависности на крају испитивања;

– вредности LD_{50}, са 95% интервалом поверења, у сваком од препоручених момената опажања, за испитивану супстанцу и токсични стандард;

– статистичке методе коришћене за одређивање LD_{50};

– смртност у контролама;

– други примећени или измерени биолошки одговори и било какво неуобичајено понашање пчела (укључујући одбијање хране третиране испитиваном дозом), брзина потрошње хране у третираним и нетретираним групама;

– било какво одступање од поступка овде описане методе испитивања и било какви други важни подаци.

3. ЛИТЕРАТУРА

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. 31.5.2008 EN Official Journal of the European Union L 142/621

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, p. 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.17. ПЧЕЛЕ – ИСПИТИВАЊЕ АКУТНЕ КОНТАКТНЕ ТОКСИЧНОСТИ

1. МЕТОДА ИСПИТИВАЊА

Метода се заснива на Упутству за испитивање OECD 214 (1998).

1.1. УВОД

Ово испитивање токсичности је лабораторијска метода дизајнирана за процену акутне контактне токсичности средстава за заштиту биља и других хемикалија на одрасле пчеле-радилице.

Поступак процене и вредновања токсичних својстава супстанци може захтевати утврђивање акутне контактне токсичности код пчела, нпр. у случајевима када је вероватно да ће пчеле бити изложене датој хемикалији. Испитивање акутне контактне токсичности изводи се да би се утврдила својствена токсичност пестицида и других хемикалија на пчеле. Резултати овог испитивања користе се за утврђивање потребе за даљим поступањем. Ова метода је посебно погодна код етапних програма за процену опасности коју пестициди представљају за пчеле, на основу хијерархијског редоследа, од лабораторијских испитивања токсичности, до полутеренских и теренских испитивања[1]. Пестициди се могу испитивати као активне супстанце (у даљем тексту: а.с.) или као формулисани производи.

Осетљивост пчела и прецизност поступка испитивања потврдити применом стандардних токсичних супстанци.

1.2. ДЕФИНИЦИЈЕ

Акутна контактна токсичност јесу штетне последице које се јављају најкасније 96 сати након контактне примене једнократне дозе испитиване супстанце

Доза јесте количина примењене испитиване супстанце. Доза се изражава као маса (mg) испитиване супстанце по јединки (mг/пчеле).

Контактна LD_{50} (средња летална доза)јесте статистички изведена једнократна доза супстанце која може изазвати смрт 50% животиња које дођу у контакт са њом. Вредност LD_{50} изражава се у (mg) испитиване супстанце по пчели. Ако се испитује дејство пестицида, испитивана супстанца може бити активна супстанца или формулисани производ који садржи једну или више активних супстанци.

Смртност јесте случај када је јединка потпуно непомична и сматра се угинулом.

1.3. ПРИНЦИП МЕТОДЕ

Одрасле пчеле радилице (*Apis melifera*) излажу се серији доза испитиване супстанце, растворене у одговарајућем носачу, директним наношењем (капљица) на грудни кош. Испитивање траје 48 сати. Уколико између 24 и 48 сата стопа смртности расте, а у контролној групи и даље остаје на прихватљивом нивоу, тј. < 10%, примерено је продужити трајање испитивања до највише 96 сати. Смртност се бележи свакодневно у току најмање 48 сати и пореди са контролним вредностима. Резултати испитивања се анализирају, да би се се израчунала вредност LD_{50} након 24 и 48 сати, а у случају да је испитивање продужено и након 72 сата и 96 сати.

1.4. КРИТЕРИЈУМИ ПРИХВАТЉИВОСТИ ИСПИТИВАЊА

Да би испитивање било прихваћено, испуњавају се услови:

– просечна смртност у контролној групи не прелази10% на крају испитивања;

– LD_{50} стандарда токсичности налази сеу одређеном опсегу.

1.5. ОПИС МЕТОДЕ

1.5.1. Сакупљање пчела

Користе се младе одрасле пчеле радилице истог рода, тј. пчеле једнаке старости, стања ухрањености итд. Пчеле се набављају из адекватно храњених, здравих колонија, без забележених болести, колико је могуће, устројених по хијерархијском принципу матице, познатог педигреа и физиолошког статуса. Могу се сакупити оног јутра када се планира почетак испитивања, или претходно вече, па се до сутрадан држе у условима који ће владати у току испитивања. Прикладне су пчеле сакупљене са оквира на којима нема јаја. Сакупљање пчела у рано пролеће или касну јесен избегавати, јер је њихова физиологија у то време промењена. Ако се испитивање изводи у рано пролеће или касну јесен, пчеле се могу излећи у инкубатору и отхранити недељу дана „пчелињим хлебом" (поленом сакупљеним из сећа) и раствором сахарозе. Пчеле третиране хемијским супстанцама (антибиотици, производи за уништавање *Varroa* гриња) није дозвољено користити за испитивање токсичности четири недеље након завршетка последњег третмана.

1.5.2. Услови смештаја и исхране

Користе се кавези који се лако чисте и добро проветравају. Могу бити од било ког прикладног материјала, нпр. нерђајућег челика, жичане мреже, пластике, а могу се користити и дрвени кавези за једнократну употребу, итд. Препоручују се групе од 10 пчела по кавезу. Величина кавеза је примерена броју пчела, како би им се пружио одговарајући простор.

Пчеле држати у тамној лабораторији на температури од 25° C ± 2° C. Релативну влажност, која уобичајено износи око 50% до 70%, бележити у току трајања целог испитивања. Поступци руковања, укључујући третман и бележење запажања, могу се обављати на дневном светлу. Као храна се користи водени раствор сахарозе, крајње концентрације од 500 g/l (50% односа тежине и запремине, w/v). Након што су дате дозе, храну давати неограничено (*ad libitum*), користећи хранилицу за пчеле. За ту намену се може користити и стаклена цевчица (дужине око 50 mm, ширине 10 mm, са отвореним крајем који се сужава до промера од око 2 mm).

1.5.3. Припрема пчела

Да би се омогућило наношење испитиване супстанце, сакупљене пчеле се могу анестезирати угљен-диоксидом или азотом. Количину употребљеног анестетика и трајање анестезије свести на најмању могућу меру. Пчеле на умору пре почетка испитивања одбацити и заменити здравим.

1.5.4. Припрема доза

Испитивану супстанцу применити као раствор у носачу, тј. растворену у органском растварачу или води, уз средство које осигурава влажност. Када је реч о органском растварачу, предност се даје ацетону, али се могу употребити и други, по пчеле нетоксични органски растварачи (нпр. диметилформамид, диметилсулфоксид). Раствори се могу лакше нанети ако се припреме у благом раствору комерцијалног средства које осигурава влажност (Agral, Cittowett, Lubrol, Triton, Tween). Реч је о комерцијалним производима диспергованим у води и високополарним органским супстанцама које се не растварају у органским растварачима,

Потребно је припремити и погодне контролне растворе, тј. код испитивања где се за растварање испитиване супстанце користи растварач или дисперзионо средство, користити две одвојене контролне групе, једну третирану водом и другу третирану растварачем/дисперзионим средством.

1.6. ПОСТУПАК

1.6.1. Испитиване и контролне групе

Број испитиваних доза и њихових реплика потребно је да задовољава статистичке захтеве у погледу одређивања LD_{50} у интервалима поверења од 95%. Обично се испитивање поставља са пет доза испитиване супстанце, у геометријској серији, са фактором не већим од 2,2 тако да буде обухваћен опсег потребан за одређивање LD_{50}. Фактор разблажења и број концентрација за дозирање одредити према нагибу криве токсичности (доза према смртности), водећи рачуна о захтевима статистичке методе одабране за анализу резултата. Прелиминарна студија у циљу утврђивања опсега испитиваних концентрација омогућује правилан избор испитиваних концентрација.

Минимално три групе реплика, свака по десет пчела, изложити дозама испитиване супстанце.

У сваком испитивању обезбедити најмање три контролне групе са по 10 пчела. Ако је коришћен неки органски растварач или средство које осигурава влажност, укључити још три додатне контролне серије са по 10 пчела у свакој од њих, које ће се третирати само растварачем, односно само агенсом који осигурава влажност.

1.6.2. Стандард токсичности

У испитиване серије е укључити и испитивање токсичности стандарда. Да би се обухватила очекивана вредност LD_{50}, одабрати најмање три дозе стандарда. Најмање три групе по 10 пчела у сваком кавезу изложити свакој дози стандарда. Као стандард токсичности обично се користи диметоат, чија се LD_{50} након 24 сата пероралне примене креће у опсегу од 0,10 mg до 0,35 mg a.c./пчели[2]. Користе се и други стандарди токсичности, ако се располаже довољном количином података о

очекиваној дозној зависности (нпр. паратион).

1.6.3. Излагање

1.6.3.1. Примена доза

Анестезиране пчеле, свака индивидуа појединачно, третирају се испитиваном супстанцом. Пчеле се групишу случајним распоредом у испитиване и контролне групе и третирају различитим дозама испитиване супстанце. По 1 ml раствора који садржи испитивану супстанцу у датој концентрацији потребно је нанети микроапликатором на дорзалну страну торакса сваке јединке. Ако за то постоји оправдање, могу се употребити и друге запремине испитиване супстанце. Након наношења испитиване супстанце, пчеле се стављају у кавезе и обезбеди им се раствор сахарозе.

1.6.3.2. Дужина испитивања

Препоручује се да испитивање траје 48 сати. Уколико смртност између 24 и 48 сата настави да расте за више од 10%, испитивање продужити до највише 96 сати, под условом да смртност у контролним групама не прелази 10%.

1.6.4. Запажања

Смртност се бележи 4 сата након примене испитиване супстанце, па након 24 сата и 48 сати. Уколико се укаже потреба да се испитивање продужи, наредне процене обавити у 24-сатним интервалима, најдуже до укупно 96 сати, под условом да смртност у контролним групама не прелази 10%.

Потребно је забележити све појаве неуобичајеног понашања током испитивања.

1.6.5. Гранична студија

У неким случајевима (нпр. када се очекује да је испитивана супстанца нетоксична) може се урадити гранична студија употребом 100 mg а.с./пчели да би се показало да LD_{50} прелази ову вредност. Треба користити исти поступак, укључујући три испитиване групе (реплике) које се излажу дози, релевантне контролне групе, процену конзумиране количине третиране хране и употребу стандарда токсичности. Уколико дође до угинућа пчела, испитивање је неопходно извести у целости. Ако се уоче сублетални ефекти (видети одељак 1.6.4. ове методе) забележити их.

2. ПОДАЦИ И ИЗВЕШТАЈ

2.1. ПОДАЦИ

Подаци се приказују у табеларној форми. За сваку испитивану групу, било да је у питању контролна или група стандардне токсичности, наводи се број испитиваних јединки, смртност у сваком изабраном тренутку опажања, као број пчела са нежељеним променама у понашању. Подаци о смртности се анализирају погодним статистичким методама (нпр. пробит-анализом, лутајућом средњом вредношћу, биномном вероватноћом)[3, 4]. Потребно је графички приказати криве дозне зависности за сваки препоручени сат посматрања, израчунати нагиб криве и средњу леталну дозу (LD_{50}) са 95% интервалом поверења. Исправке везане за смртност у контролној групи се могу урадити помоћу Аботове корекције[4, 5]. Ако третирана храна није у потпуности конзумирана, потребно је одредити дозу испитиване супстанце коју је заиста конзумирала свака група. LD_{50} изразити у mg испитиване супстанце по пчели.

2.2. ИЗВЕШТАЈ

Извјештај о испитивању садржи податке о:

1) испитиваној супстанци:

– физичка својства и релевантна физичка и хемијска својства (нпр. постојаност у води, напон паре);

– подаци од значаја за хемијску идентификацију супстанце, укључујући структурну формулу, чистоћу (нпр. ако се ради о пестицидима, генерички назив и концентрацију активних супстанци).

2) испитиваној врсти:

– латински назив, род, приближна старост (у недељама), метода прикупљања, датум прикупљања;

– подаци о колонијама из којих су сакупљене пчеле, укључујући здравствено стање колонија, присуство болести код одраслих примерака, било какав претходни третман, итд.

3) условима током испитивања:

– температура и релативна влажност у лабораторији;

– услови смештаја испитиваних јединки, укључујући врсту, величину кавеза и материјал од којег су направљени;

– методе примене испитиване супстанце, нпр. коришћен растварач – носач, примењена запремина раствора, коришћени анестетици;

– поставка испитивања, нпр. број коришћених концентрација и број контрола (број кавеза репликата и број пчела по кавезу за сваку концентрацију и контролу);

– датум испитивања.

4) резултатима:

– резултати прелиминарног испитивања за одређивање опсега доза, ако је рађена;

– необрађени подаци – смртност у свакој од испитиваних концентрација, у сваком сату опажања;

– графички приказ криве дозне зависности на крају испитивања

– вредности LD_{50}, са 95% интервалом поверења, у сваком од препоручених момената опажања, за испитивану супстанцу и токсични стандард;

– статистичке методе коришћене за одређивање LD_{50};

– смртност у контролама;

– други биолошки одговори и било какво неуобичајено понашање пчела;

– било какво одступање од поступка овде описане методе испитивања и други битни подаци.

3. ЛИТЕРАТУРА

1. EPPO/Council of Europe (1993) Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment ofPlant Protection Products – Honeybees. EPPO bulletin, vol. 23, N.1, p. 151-165. March, 1993.

2. Gough, H. J., McIndoe, E.C., Lewis, G.B., (1994) The use of dimethoate as a reference compound inlaboratory acute toxicity tests on honeybees (*Apis mellifera* L.), 1981-1992. Journal of ApiculturalResearch 22, p. 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. АДСОРПЦИЈА /ДЕСОРПЦИЈА ПОМОЋУ МЕТОДЕ РАВНОТЕЖЕНОГ СТАЊА

Део први

1. МЕТОДА ИСПИТИВАЊА

Метода се заснива на Упутству за испитивање OECD 106, у делу који се односи на утврђивање адсорпције/десорпције на честице земљишта помоћу методе равнотежног стања[XVII].

_____

XVII Determination of Soil Adsorption/Desorption, using a Batch Equilibrium Method (2000)

1.1. УВОД

Метода испитивања узима у обзир међулабораторијско поређење и радионицу на тему избора земљишта за развој методе испитивања адсорпције[1, 2, 3, 4], као и постојеће смернице на националном нивоу[5, 6, 7, 8, 9, 10, 11].

Студије адсорпције/десорпције корисне су као извор кључних података о кретању хемикалија и њиховој расподели у земљишту, води и ваздуху као деловима биосфере[12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21]. Подаци се могу употребити за предвиђање и утврђивање, нпр. доступности хемикалије за разградњу[22, 23], њене трансформације и уноса у организме[24], испирања и процеђивања кроз различите профиле земљишта[16, 18, 19, 21, 25, 26, 27, 28], испаравања из земљишта[21, 29, 30] и отицања са земљишних површина у воде[18, 31, 32]. Подаци о адсорпцији могу се користити за поређење и моделовање[19, 33, 34, 35].

Расподела хемикалије између чврсте и течне фазе сложен је процес, који зависи од бројних различитих фактора: хемијске природе супстанце[12, 36, 37, 38, 39, 40] карактеристика земљишта[4, 12, 13, 14, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49] и климатских фактора као што су падавине, температура, сунчева светлост и ветар. Због тога се бројне појаве и механизми укључени у процес адсорпције хемикалија у земљишту не могу у потпуности дефинисати поједностављеним лабораторијским моделом, какав представља ова метода. Иако овај покушај не може покрити све случајеве који се у природи могу догодити, он пружа вредне податке о еколошком значају процеса адсорпције хемикалије.

Видети Општи увод.

1.2. ОБЛАСТ ПРИМЕНЕ

Метода се користи за процену понашања хемикалије у различитим земљиштима, у смислу њене адсорпције/десорпције на честице земљишта. Циљ је добијање сорпционе вредности која се може користити за предвиђање расподеле супстанце у различитим еколошким условима. Досадашњим истраживањима утврђено је да су равнотежни адсорпциони коефицијенти хемикалије у различитим типовима земљишта у функцији карактеристика земљишта (нпр. садржај органског угљеника, иловаче, текстура и pH вредност земљишта). Да би се у најширем смислу обухватиле све интеракције одређене супстанце и различитих типова земљишта природног порекла, за испитивање се користе различити типови узорака земљишта.

У оквиру ове методе, адсорпција представља процес везивања хемикалије за површине земљишта. Њоме се не могу

утврдити разлике између различитих процеса адсорпције (физичка и хемијска адсорпција), нити процеси попут површински катализиране разградње, масивне адсорпције и хемијске реакције.

Адсорпција на колоидне честице (пречника < 0,2 μм) које ствара земљиште није узета у обзир.

Својства земљишта за која се сматра да су најважнија за адсорпцију су:

– садржај органског угљеника у земљишту[3, 4, 12, 13, 14, 41, 43, 44, 45, 46, 47, 48];

– садржај иловаче у земљишту и текстура земљишта[3, 4, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48] и

– pH вредност једињења подложних јонизацији[3, 4, 42].

Друга својства земљишта која могу имати утицаја на адсорпцију/десорпцију одређене супстанце су:

– ефективни капацитет измене катјона (Effective Cation Exchange Capacity, у даљем тексту: ECEC);

– садржај аморфног гвожђа и алуминијумових оксида, нарочито у вулканским и тропским земљиштима[4] и

– специфична површина земљишта[49].

Метода испитивања је осмишљена тако да омогући вредновање адсорпције хемикалије на различите врсте земљишта, у односу на садржај угљеника, иловаче, текстуру, као и pHвредност.

Испитивање обухвата три етапе:

1) прва етапа је прелиминарна студија којом се утврђује:

– однос земљишта и раствора;

– време потребно за достизање равнотежног стања адсорпције;

– количина испитиване супстанце која се адсорбовала у тренутку достизања равнотежног стања;

– адсорпција испитиване супстанце на површине посуда и стабилност испитиване супстанце за време трајања испитивања;

2) друга етапа је скрининг тест:

– адсорпција се проучава на пет различитих врста земљишта (помоћу кинетике адсорпције при једној јединој концентрацији и одређивањем коефицијента расподеле K_d и K_{oc});

3) трећа етапа:

– одређивање Фројндлихових адсорпционих изотерми ради утврђивања утицаја концентрације на степен адсорпције на честице земљишта (студија десорпцијена основу кинетике десорпције/Фројндлихове десорпционе изотерме – видети Део други ове методе).

1.3. ДЕФИНИЦИЈЕ И МЕРНЕ ЈЕДИНИЦЕ

Симбол	Дефиниција	Јединица
At_i	проценат адсорпције у времену t_i	%
A_{eq}	проценат адсорпције код равнотежног стања адсорпције	%
$m_s^{ads}(t_i)$	маса испитиване супстанце адсорбоване на земљиште у времену t_i	μg
$m_s^{ads}(\Delta t_i)$	маса испитиване супстанце адсорбоване на земљиште у временском интервалу Δt_i	mg
$m_s^{ads}(eq)$	маса испитиване супстанце адсорбоване на земљиште у равнотежном стању адсорбције	mg
m_0	маса испитиване супстанце у испитиваној посуди на почетку испитивања адсорпције	mg
$m_{aq}^{ads}(t_i)$	маса испитиване супстанце измерена у аликвотима(v_a^A)у тачки времена t_i	mg
$m_{aq}^{ads}(eq)$	маса супстанце у раствору при равнотежном стању адсорпције	mg
$m_{земљишта}$	количина земљишне фазе, изражена као сува маса земљишта	g
C_{st}	масена концентрација основног раствора супстанце	mg/cm^3
C_0	почетна масена концентрација испитиваног раствора у додиру са земљиштем	mg/cm^3
$C_{aq}^{ads}(t_i)$	масена концентрација супстанце у течној фази у времену t_iу којем се обавља анализа	mg/cm^3
$C_s^{ads}(eq)$	садржај супстанце адсорбоване на земљиште при равнотежном стању адсорбције	mg/g
$C_{aq}^{ads}(eq)$	масена концентрација супстанце у течној фази при равнотежном стању адсорпције	mg/cm^3
V_0	Почетна запремина течне фазе у додиру са земљиштем за време испитивања адсорпције	cm^3
v_a^A	запремина аликвота у којима се мери испитивана супстанца	cm^3
K_d	коефицијент расподеле адсорпције	cm^3/g
K_{oc}	нормализован коефицијент адсорпције органског угљеника	cm^3/g
K_{om}	нормализован коефицијент расподеле органске материје	cm^3/g

K_F^{ads}	Фројндлихова адсорпциона константа	$\mu g^{1-1/n} (cm^3)^{1/n} g^{-1}$
1/n	Фројндлихов експонент	/
D_{t_i}	проценат десорпције у времену t_i	%
$D_{\Delta t_i}$	проценат десорпције у временском интервалу Δt_i	%
K_{des}	Очигледна привидна десорпциона константа	cm^3/g
K_F^{des}	Фројндлихова десорпциона константа	$\mu g^{1-1/n} (cm^3)^{1/n} g^{-1}$
$m_{aq}^{des}(t_i)$	маса испитиване супстанце десорбоване из земљишта у времену t_i	μg
$m_m^{des}(\Delta t_i)$	маса испитиване супстанце десорбоване из земљишта за време Δt_i	μg
$m_{ni}^{des}(eq)$	маса супстанце аналитички одређена у течној фази при равнотежном стању десорпције	μg
$m_{aq}^{des}(eq)$	укупна маса испитиване супстанце десорбована при равнотежном стању десорпције	μg
$m_s^{des}(\Delta t_i)$	маса супстанце која остаје адсорбована на земљишту након временског интервала Δt_i	μg
m_{aq}^{Λ}	маса остатка супстанце након достизања равнотежног стања адсорпције због непотпуне замене запремине	μg
$C_s^{des}(eq)$	садржај испитиване супстанце који је остао адсорбован на земљиште код равнотежног стања десорпције	μg/cm
$C_{aq}^{des}(eq)$	масена концентрација испитиване супстанце у течној фази при равнотежном стању десорпције	$\mu g/cm^3$
V_T	укупна запремина течне фазе у додиру са земљиштем у току кинетике десорпције, урађена редном методом	cm^3
V_R	запремина супернатанта уклоњеног из епрувете (након успостављеног равнотежног стања адсорпције) и замењеног истом запремином 0,01 M раствора $CaCl_2$	cm^3
v_a^D	запремина аликвота узетих у аналитичке сврхе у времену(i),у току студија кинетике десорпције урађене редном методом	cm^3
V_r^n	запремина раствора узетог из *i*-теепрувете за мерење испитиване супстанце, у студијама кинетике десорпције (паралелна метода)	cm^3
V_r^F	запремина раствора узетог из епрувете за мерење испитиване супстанце, у тренутку успостављања равнотежног стања десорпције	cm^3
MB	масени баланс	%
m_E	укупна маса испитиване супстанце екстрахована из земљишта и са зидова посуде за испитивање у две етапе	μg
V_{rez}	запремина супернатанта узетог након успостављања равнотеже адсорпције	cm^3
P_{ow}	коефицијент расподеле у систему *n*-октанол/вода	/
pK_a	константа дисоцијације	/
S_w	растворљивост у води	g/l

1.4. ПРИНЦИП МЕТОДЕ

Позната запремина раствора испитиване супстанце необележене или обележене радиоизотопом и заступљене у 0,01 M раствору $CaCl_2$ у познатим концентрацијама, додаје се узорцима земљишта познате суве масе, претходно уравнотеженим у 0,01 M раствору $CaCl_2$. Смеша се довољно дуго протреса. Суспензија земљишта се затим одвоји центрифугирањем и ако се жели, филтрацијом, а затим се течна фаза подвргава анализи. Количина испитиване супстанце адсорбована на узорак земљишта, израчунава се као разлика између количине испитиване супстанце која се првобитно налазила у раствору и

количине која је остала на крају испитивања (индиректна метода).

Могуће је и да се адсорбована количина испитиване супстанце одреди директно, анализом земљишта (директна метода). Овај поступак, који укључује постепену екстракцију земљишта одговарајућим растварачем, препоручује се у случајевима када се разлика у концентрацији испитиване супстанце у раствору не може тачно одредити. Примери оваквих случајева су: адсорпција испитиване супстанце на површину испитиваних посуда, нестабилност испитиване супстанце у времену потребном да се спроведе испитивање, слаба адсорпција која резултира незнатном променом концентрације испитиване супстанце у раствору, или јака адсорпција, која резултира тако ниском концентрацијом испитиване супстанце у раствору да се не може тачно одредити. Ако се испитивана супстанца обележи радиоизотопом, екстракцију земљишта могуће је избећи анализом чврсте фазе, сагоревањем и бројањем помоћу течног сцинтилационог бројача. Бројање течним сцинтилационим бројачем неспецифична је техника којом се не могу разликовати почетне супстанце од продуката трансформације; па је користити искључиво уколико је испитивана хемикалија стабилна у току студије.

1.5. ПОДАЦИ О ИСПИТИВАНОЈ СУПСТАНЦИ

Хемијски реагенси су аналитичке чистоће. Препоручује се употреба необележене испитиване супстанце познатог састава и ако је могуће, хемијске чистоће од најмање 95%, или употреба радиоизотопом обележене испитиване супстанце познатог састава и радиолошке чистоће. Ако се користе краткоживећи радиоизотопи, учинити корекције с обзиром на њихово време полураспада.

Пре извођења испитивања адсорпције/десорпције потребно је да буду доступни следећи подаци о испитиваној супстанци:

– растворљивост у води (видети Методу А.6. која је дата у овом правилнику);

– напон паре испитиване супстанце (видети Методу А.4. која је дата у овом правилнику), односно Хенријева константа;

– абиотичка разградња, односно хидролиза као функција pH вредности (видети Методу С.7. која је дата у овом прилогу);

– коефицијент расподеле у систему *n*-октанол/вода (видети Методу А.8. која је дата у овом правилнику);

– брза биоразградљивост (видети Методу С.4. која је дата у овом прилогу), односно аеробна и анаеробна трансформација у земљишту;

– pK_a супстанци подложних јонизацији;

– директна фотолиза у води (тј. UV-vis апсорпциони спектар у води, квантни допринос) и фоторазградња на земљишту.

1.6. ПРИМЕНЉИВОСТ МЕТОДЕ

Метода испитивања је примењива за испитивање хемијских супстанци за које је доступна аналитичка метода задовољавајуће тачности. Важан параметар, који може утицати на поузданост резултата, посебно ако се користи индиректна метода, је стабилност испитиване супстанце у времену потребном да се испитивање изведе. Као предуслов за извођење оваквог испитивања проверити стабилност испитиване супстанцеу прелиминарној студији. Ако се примети да је дошло до трансформације испитиване супстанце у времену потребном да се испитивање изврши, препоручује се да се главно испитивање изведе тако да се анализира и чврста и течна фаза.

Тешкоће се могу јавити ако се овом методом испитују супстанце слабо растворљиве у води (S_w од 10 g/l до 4 g/l), као и супстанце високог набоја и то због тога што се концентрације оваквих супстанци у течној фази не могу довољно тачно аналитички измерити. У оваквим случајевима предузети додатне кораке. Упутство о томе како решити овакве проблеме дато је у овој методи.

Ако се испитују испарљиве супстанце, предузимају се мере опреза како би се у току студије избегли губици.

1.7. ОПИС МЕТОДЕ

1.7.1. Апаратура и хемијски реагенси

Опрема за испитивање садржи стандардну лабораторијску апаратуру, а посебно:

1) кивете, односно посуде у којима ће се извести испитивање и које:

– стају директно у центрифугу како би се грешке настале приликом руковања и преношења узорака свеле на минимум;

– су од инертног материјала, чиме се адсорпција испитиване супстанце на њихове површине своди на најмању могућу меру;

2) уређај за мешање

– додатни вибрациони уређај (shaker или Vortex) или еквивалентна опрема (за време протресања у уређају земљиште остаје суспендовано);

3) центрифугу

– ако је могуће велике брзине (нпр. силе центрифугирања > 3000 g), термостатирана, способна да из воденог раствора уклони честице пречника већег од 0,2 μm. Током протресања и центрифугирања посуде за испитивање су затворене, да би се

избегло испаравање и губитак воде. Потребно је употребити деактивиране чепове (нпр. навојни чепови од тефлона) како би се адсорпција на чепове свела на минимум;

4) уређај за филтрацију (опционо)

– филтери промера 0,2 µm, стерилни, за једнократну употребу. Посебну пажњу посветити избору материјала за филтере, како би се избегли губици испитиване супстанце на њима. За слабо растворљиве испитиване супстанце не препоручује се употреба филтера од органског материјала;

5) аналитички уређаји

– прикладни за мерење концентрације испитиване хемикалије;

6) лабораторијска сушница

– у стању да одржава температуру (термостат) од 103° C до 110° C.

1.7.2. Карактеризација и избор земљишта

Земљиште окарактерисати са три параметра за које се сматра да су у великој мери одговорни за адсорпцијски капацитет: садржајем органског азота, иловаче, текстуром земљишта и pH вредношћу. Како је раније напоменуто (видети одељак 1.2. ове методе), на адсорпцију/десорпцију одређене супстанце утичу и друга физичка и хемијска својства, која се у оваквим случајевима узимају у обзир.

Методе карактеризације земљишта од изузетне су важности и могу имати значајан утицај на резултате. Препорука је да се pH земљишта измери у 0,01 M раствору $CaCl_2$ (раствор који се користи при испитивању адсорпције/десорпције) у складу са одговарајућом ISO методом (ISO-10390-1). Остала релевантна својства земљишта препоручљиво је одредити у складу са стандардним методама (нпр. ISO „Приручник за анализу земљишта”). Ово омогућава да анализа података о адсорпцији у земљишту буде базирана на параметрима квалитета земљишта стандардизованим на међународном нивоу. Нека упутства и смернице у погледу постојећих стандардних метода анализе земљишта наведени су у литератури 50–52. Ради калибрације метода испитивања земљишта препоручљиво је користити референтна земљишта.

Смернице у погледу избора различитих типова земљишта за испитивање адсорпције/десорпције, дате су у Табели 1. Седам одабраних типова земљишта покрива врсте земљишта са којима се сусреће у географским подручјима умереног климатског појаса. Ако се испитују супстанце подложне јонизацији, одабрани типови земљишта покривају широк опсег pH вредности, како би се вредновала адсорпција јонизованог и нејонизованог облика супстанце. Смернице у погледу тога колико различитих типова земљишта се користи у различитим фазама испитивања, дате су у одељку 1.9. ове методе.

Ако се предност даје другим врстама земљишта, ближе их означити истим параметрима као и земљишта наведена у Табели 1, чак и ако у потпуности не задовољавају критеријуме. Варијабилност њихових својстава је једнака.

Табела 1: Смернице у погледу избора узорака земљишта
за испитивање адсорпције/десорпције

Тип земљишта	pH опсег (у 0,01 M $CaCl_2$)	Садржај органског угљеника (%)	Садржај глине (%)	Текстура земљишта[XVIII]
1	4,5-5,5	1,0-2,0	65-80	глина
2	> 7,5	3,5-5,0	20-40	глиновита иловача
3	5,5-7,0	1,5-3,0	15-25	муљевита иловача
4	4,0-5,5	3,0-4,0	15-30	иловача
5	< 4,0 - 6,0[73]	< 0,5-1,5[XVII, XX]	< 10-15[XVI]	иловачасти песак
6	> 7,0	< 0,5-1,0[XVII, XVIII]	40-65	глиновита иловача/ глина
7	< 4,5	> 10	< 10	песак / иловачасти песак

_____

XVIII Према FAO и US систему[85].

XIX Променљиве би требале показивати вредности унутар датог опсега. Ако се појаве потешкоће у налажењу одговарајућег земљишног материјала, прихватљиве су вредности испод наведеног минимума.

XX Земљишта са уделом органског угљеника мањим од 0,3% могу сметати у корелацији између садржаја органске материје и адсорпције. Због тога се препоручује употреба земљишта са садржајем органског угљеника од 0,3%.

1.7.3. Сакупљање и чување узорака земљишта

1.7.3.1. Сакупљање

Не препоручује се употреба посебне технике ни алата за узимање узорка земљишта. Техника зависи од циља студије.

Узети у обзир:

– да је потребно располагати детаљним подацима о теренском локалитету. Ово укључује локацију, биљни покривач, третмане пестицидима, односно ђубривима, биолошке додатке и случајно загађење. У погледу описа локалитета са кога се узимају узорци, потребно је придржавати се препорука садржаних у ISO-стандарду за узимање узорака земљишта (ISO 10381-6);

– да се локалитет са којег се узимају узорци дефинише помоћу UTM мреже (Universal Transversal Mercator-Projection/ European Horizontal Datum), или географских координата. Ово може омогућити да се узорак земљишта убудуће поново узме са истог локалитета, или може помоћи да се земљиште дефинише у различитим класификационим системима, коришћеним у различитим земљама. Узорке земљишта прикупљати искључиво из хоризонта А, на дубини до највише 20 cm, нарочито ако се ради о земљишту типа број 7. Ако у земљишту као интегрални део постоји слој O_h, узорак узети и из овог хоризонта.

Узорке тла превести у контејнерима и под температурним условима који обезбеђују да се првобитна својства земљишта неће значајно променити.

1.7.3.2. Складиштење

Предност се даје употреби узорака земљишта непосредно узетих са терена. Само у случају када то није могуће, узорци земљишта складиште се на амбијенталној температури, с тим да се спречи исушивање на ваздуху. Препорука у погледу ограничења трајања складиштења нема, али се узорци земљишта складиштени дуже од три године пре употребе поново анализирају, како би се утврдио садржај угљеника, pH и CEC.

1.7.3.3. Руковање узорцима земљишта и њихова припрема за испитивање

Узорке земљишта осушити на ваздуху, на амбијенталној температури (ако је могуће између 20° C и 25° C). Узорке земљишта нежно растрести, применом најмање могуће силе, да се што је мање могуће промени изворна текстура земљишта. Узорци земљишта се просејавају до честица величине ≤ 2 mm. Код процеса просејавања, придржавати се препорука садржаних у ISO стандарду за узимање узорака земљишта (ISO 10381-6). Препоручује се да се узорци пажљиво хомогенизују, јер то побољшава поновљивост резултата. Садржај влаге у сваком типу земљишта одређује се у три аликвота, сушењем на 105 °C довољно дуго док значајне промене у тежини више нема (око 12 сати). У свим израчунавањима појам масе земљишта односи се на у сушилици постигнуту суву масу, тј. на тежину земљишта кориговану у односу на садржај влаге.

1.7.4. Припрема испитиване супстанце за наношење на земљиште

Испитивана супстанца се раствори у 0,01 M раствору $CaCl_2$ у дестилованој или дејонизованој води. Да би се центрифугирање побољшало, а измена катјона свела на најмању могућу меру, раствор $CaCl_2$ се користи као течна фаза растварача. Концентрација основног раствора је, ако је могуће, три реда величине већа од границе детекције употребљене аналитичке методе. Овакав праг обезбеђује тачност мерења методологијом уобичајеном за ову методу испитивања. Концентрација основног раствора је нижа од растворљивости испитиване супстанце у води.

Основни раствор, ако је могуће, припремити непосредно пре наношења на узорке земљишта и чувати затворен у мраку на температури од 4 °C. Трајање складиштења зависи од стабилности испитиване супстанце и њене концентрације у раствору.

Само код тешко растворљивих супстанци ($S_w < 10^{-4}$ g/l) може се указати потреба за употребом адекватног средства које олакшава растварање испитиване супстанце. Ово средство:

1. се меша са водом, као што је то случај код метанола или ацетонитрила,

2. његова концентрација не прелази 1% укупне запремине основног раствора, а удео је мањи од онога у раствору испитиване супстанце која долази у додир са земљиштем (ако је могуће мањи 0,1%) и

3. није сурфактант, нити подлеже солволитичким реакцијама са испитиваном хемикалијом.

У извештају навести и оправдати употребу средства које олакшава растварање.

Друга могућност, која стоји на располагању када су у питању тешко растворљиве супстанце, је да се у систем за испитивање супстанца дода режимом пулсације. Испитивана супстанца се раствори у органском растварачу, а потом се аликвот тог раствора дода у систем земљишта и 0,01 M раствор $CaCl_2$ у дестилованој или дејонизованој води. Удео органског растварача у течној фази одржавати што је могуће мањим, у уобичајеним околностима не вишим од 0,1%. Проблем који се при оваквом начину рада може јавити јесте немогућност да се при следећем додавању поновно дода иста запремина. Овакво додавање испитиване супстанце из органског раствора може довести до додатне грешке, због тога што се може десити да концентрације испитиване супстанце и додатног растварача у свим испитивањима не буду исте.

1.8. ПРЕДУСЛОВИ ЗА ПРИМЕНУ МЕТОДЕ ИСПИТИВАЊА АДСОРПЦИЈЕ/ДЕСОРПЦИЈЕ

1.8.1. Аналитичка метода

У кључне параметре који могу утицати на тачност мерења адсорпције спадају: тачност аналитичке методе употребљене

за анализу раствора и за анализу адсорбоване фазе; стабилност и хемијска чистоћа испитиване супстанце; постизање адсорпционе равнотеже; величина промена у концентрацији раствора, однос земљишта и раствора, као и промене у структури земљишта до којих је дошло у току процеса достизања равнотеже[35, 59, 60, 61, 62]. Примери у којима се дају подаци о тачности, наведени су у Делу другом ове методе.

Поузданост употребљене аналитичке методе проверити у опсегу концентрација за који је вероватно да ће бити примењен у испитивању. Лице које изводи испитивање има слободу да развије адекватну методу, задовољавајуће тачности, прецизности, поновљивости, граница детекције и ефикасности. Смернице како извести овакво испитивање наведене су у овој методи.

Адекватна запремина 0,01 M раствора $CaCl_2$, нпр. 100 cm^3, протресе се у току 4 сата са нешто земљишта, нпр. 20 g земљишта високе моћи адсорпције, тј. високог садржаја угљеника и иловаче. У зависности од аналитичких потреба, ове тежине и запремине могу варирати, али примерену исходишну тачку чини однос земљишта и раствора од 1:5. Смеша се центрифугира, а течна фаза се може и филтрирати. Како би се постигло да номинална концентрација испитиване супстанце буде унутар опсега концентрација за који је вероватно да ће у току испитивања бити актуелан, у течну фазу се додаје извесна запремина основног раствора испитиване супстанце. Ова запремина не сме прелазити 10% коначне запремине течне фазе, како би промена природе раствора којом се располаже пре постизања равнотежног стања, била што мања. Након тога раствор се анализира.

Да би се проверило да ли у аналитичкој методи постоје артефакти, као и за ефекте матрикса узрокованог земљишта, потребно је испитати и један контролни узорак, који се састоји од система земљишта и раствора $CaCl_2$ (без испитиване супстанце).

У аналитичке методе које се могу употребити за мерења сорпције, спадају гасно–течна хроматографија (*gas-liquid chromatography*, у даљем тексту: GLC), течна хроматографија високих перформанси (*high-performance liquid chromatography*, у даљем тексту: HPLC), спектрометрија (нпр. GC/масена спектрометрија, HPLC/масена спектрометрија) и бројање помоћу течних сцинтилационих бројача (код испитивања супстанци обележеним радиоизотопом). Независно од аналитичке методе која се употреби, задовољавајућа ефикасност аналитичке технике је потребно да буде између 90% и 110% номиналне вредности. Да би детекција и вредновање уследили након расподеле, границе детекције употребљене аналитичке методе су најмање два реда величине ниже од номиналне концентрације испитиване супстанце.

Својства и границе детекције аналитичке методе одабране за проучавање адсорпције имају важну улогу у дефинисању испитивања услова, као и у целокупној поставци. Ова метода следи општи ток испитивања и даје препоруке и смернице за алтернативна решења којима се прибегава у случајевима када аналитичка метода и опремљеност лабораторије могу наметнути извесна ограничења.

1.8.2. Избор оптималног односа земљиште/раствор

Избор односа земљишта и раствора примерених за изучавање сорпције зависи од коефицијента расподеле K_d, као и од тога који се релативни степен адсорпције жели постићи. С обзиром на облик једначине адсорпције и домет аналитичке методологије, при одређивању концентрације хемикалије у раствору, статистичку тачност мерења одређује промена те концентрације. Стога је у рутинској пракси корисно успоставити неколико фиксних односа, при којима је проценат адсорпције виши од 20%, а ако је могуће и виши од 50%[62], при чему пазити да се концентрација испитиване супстанце у течној фази одржава довољно високом да се може тачно измерити. Ово је нарочито важно у случају када се адсорпција збива у високим процентима.

Практичан приступ избору доброг односа земљиште/вода утемељен је на утврђивању K_d вредности прелиминарним студијама или утврђеним техникама (видети Део четврти ове методе). Адекватан однос може се одабрати на основу криве на којој је, за фиксне проценте адсорпције, однос земљишта и раствора приказан у односу на K_d (Слика 1). Ова крива се базира на претпоставци да је једначина адсорпције линеарна[XXI]. Примењив однос се добија преправком једначине [4] од K_d, у облик једначине[1]:

$$\frac{V_0}{m_{sol}} = \left(\frac{m_0}{m_s^{ads}(eq)} - 1\right) K_d \qquad [1]$$

или у њеном логаритамском облику, уз претпоставку да је $R = \frac{m_{земљишта}}{V_0}$ и $\frac{A_{eq}\%}{100} = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_0}$:

$$\log R = -\log K_d + \log\left[\frac{(A_{eq}\%/100)}{(1 - A_{eq}\%/100)}\right] \qquad [2]$$

Слика 1: Однос земљишта и раствора и K_d при различитим процентима адсорпције испитиване супстанце

Потребни односи количина земљишта и раствора приказани су на Слици 1 као функција K_d, и то при различитим нивоима адсорпције. На пример, при односу земљишта и раствора од 1:5 и вредности K_d од 20, адсорбоваће се приближно 80% испитиване супстанце. Да би се при истом K_d добила адсорпција од 50%, потребно је употребити однос од 1:25. Овај приступ избору погодних односа земљишта и раствора истраживачу омогућује флексибилност потребну да задовољи захтеве испитивања.

Проблем који је теже решив односи се на ситуацију када се хемикалија изузетно добро или незнатно адсорбује. Кад је адсорпција слаба, препоручује се употреба односа земљишта и раствора од 1:1, иако када су у питању неке изразито органске врсте земљишта, добијање житког, густог раствора може изискивати и мање размере. Пажњу усмерити на то да изабраном аналитичком методологијом буде могуће измерити мале промене у концентрацији раствора. У супротном би мерење адсорпције било нетачно. Како би у раствору остала значајна количина хемикалије, при врло високим коефицијентима расподеле (K_d) однос земљишта и раствора може доћи и до 1:100. Треба обезбедити добро мешање земљишта и раствора и да се систему остави одговарајуће време да се уравнотежи. Алтернативни приступ томе како се носити са оваквим екстремним случајевима, за које нема одговарајуће методологије, је да се вредност K_dпредвиди применом техника процене базираним, нпр. на вредностима K_{ow} (видети Део четврти ове методе). Ово може бити корисно ако се испитују незнатно адсорбоване/поларне хемикалије, чији је K_{ow} < 20 као и липофилне/високосорптивне хемикалије чија K_{ow} износи > 104.

_____

XXI $C_s^{ads}(eq) = K_d \times C_w^{aq}(eq)$

1.9. ИЗВОЂЕЊЕ МЕТОДЕ

1.9.1. Услови испитивања

Испитивања се изводе на амбијенталној температури, ако је могуће константној, у опсегу између 20° C и 25° C.

Услови под којима се центрифугира омогућавају да се из раствора одстране честице веће од 0,2 µм. Ова доња гранична вредност изабрана је циљано, јер одговара пречнику најмање честице која се сматра чврстом и представља границу између чврстих и колоидних честица. Смернице о томе како одредити услове под којима ће се центрифугирати дати су у Делу петом ове методе.

Ако расположива опрема за центрифугирање не може гарантовати одстрањивање честица већих од 0,2 µм, примењује се комбинација центрифугирања и филтрације. Да би се избегли губици испитиване супстанце било које врсте, ови филтри су од прикладног инертног материјала. Потребно је доказати да у току филтрације није дошло ни до каквих губитака испитиване супстанце.

1.9.2. Етапа 1: прелиминарна студија

Циљ прелиминарне студије већ је наведен у одељку 1.2. ове методе. Смернице о постављању оваквог испитивања наведене су у овој методи.

1.9.2.1. Избор оптималних односа количина земљишта и раствора

Користе се две врсте земљишта и три односа количина земљишта и раствора (шест експеримената). Једна врста

земљишта има висок садржај органског угљеника и низак садржај иловаче, а друга низак садржај органског угљеника и висок садржај иловаче. Сугерише се употреба следећих односа:

– 50 g земљишта и 50 cm^3 воденог раствора испитиване супстанце (однос 1/1),

– 10 g земљишта и 50 cm^3 воденог раствора испитиване супстанце (однос 1/5),

– 2 g земљишта и 50 cm^3 воденог раствора испитиване супстанце (однос 1/25).

Најмања количина земљишта на којој се експеримент може извести зависи од опремљености лабораторије и ефикасности примењених аналитичких метода. Да би се испитивањем добили поуздани резултати, препоручује се употреба 1 g, а ако је могуће и 2 g узорка земљишта.

Да би се проверила стабилност испитиване супстанце у раствору $CaCl_2$ и могућа адсорпција на површине посуде за испитивање, један контролни узорак, у ком се налази само испитивана супстанца у 0,01 M раствору $CaCl_2$ (без земљишта) подвргава се истим поступцима као и испитивани системи.

Истој испитиваној процедури подвргава се и по једна слепа проба за сваки узорак земљишта, коју чини иста количина земљишта и 0,01 M раствора $CaCl_2$ (али без испитиване супстанце), укупне запремине од 50 cm^3. Током анализе, овај узорак служи као основна контрола која омогућава откривање интерферентних супстанци, или загађених земљишта.

Сва испитивања, укључујући и она који се обављају на контролама и слепим пробама, поставити најмање у дупликату. Укупан број узорака које је потребно припремити за студију може се израчунати према методологији која се примењује.

Методе које се примењују у оквиру прелиминарне студије начелно су истоветне методама које се примењују у главној студији, а изузеци од тог правила су наведени.

Узорци земљишта, ваздушно осушени, уравнотежују се тако што се дан пре почетка испитивања, у току ноћи (12 сати) протресу заједно са најмање 45 cm^3 0,01 M раствора $CaCl_2$. Потом се додаје извесна запремина основног раствора, како би се добила крајња запремина од 50 cm^3. Ова запремина додатог основног раствора:

1. не прелази 10% крајње запремине течне фазе од 50 cm^3, како би се природа раствора пре уравнотежења што мање променила и

2. ако је могуће потребно је постићи да првобитна концентрација испитиване супстанце која се налази у додиру са земљиштем (C_0) буде за најмање два реда величине виша од границе детекције употребљене аналитичке методе.

Овакав праг обезбеђује тачна мерења чак и у случајевима јаке адсорпције (> 90%), али и накнадно одређивање адсорпционих изотерми. Препоручује се и да, уколико је изводљиво, почетна концентрација испитиване супстанце (C_0) не пређе половину вредности њене граничне растворљивости.

У овој методи дат је пример како се израчунава концентрација основног раствора (C_{st}). Граница детекције од 0,01 μg/cm^3 и адсорпција од 90% се претпостављају, па почетна концентрација испитиване супстанце која је у додиру са земљиштем износи 1 μg/cm^3 (да за два реда величине прелази границу детекције аналитичке методе). Уз претпоставку да је додата највиша препоручена запремина основног раствора, тј. 5 cm^3 до 45 cm^3 0,01 M уравнотеженог раствора $CaCl_2$ (= 10% основног раствора, додате у водену фазу до укупне запремине од 50 cm^3), концентрација основног раствора износи 10 μg/cm^3 јер тако прелази границу детекције аналитичке методе за три реда величине.

Вредност pH течне фазе измерити пре и након додира са земљиштем, јер је pH вредност значајна у целокупном процесу адсорпције, посебно супстанци подложних јонизацији.

Смеша се протресе док се не постигне адсорпциона равнотежа. Време потребно да се у земљиштима постигне равнотежа изразито је варијабилно и зависи од хемикалије и земљишта. Углавном је довољан период од 24 сата[77]. У оквиру прелиминарног испитивања, узорци се кроз период мешања од 48 сати прикупљају редно (нпр. 4-ти, 8-ми, 24. и 48. сат). Временски распоред обављања анализе размотрити флексибилно, поштујући радно време и радни распоред лабораторије.

Анализа испитиване супстанце у течној фази може се обавити на два могућа начина – паралелном и редном методом. Паралелна метода са испитиваног гледишта је дуготрајнија и заморнија, а математичка обрада добијених резултата је једноставнија (видети Део шести ове методе). Избор методологије која се примењује препушта се лицу које изводи испитивање, а које при доношењу одлуке узима у обзир опремљеност доступне лабораторије и ресурсе који су јој стављени на располагање.

1. Паралелна метода – припреме се узорци међусобно истог количинског односа земљишта и раствора, у броју који одговара броју временских интервала у којима се жели проучити кинетика адсорпције. Након центрифугирања и филтрације, течна фаза прве кивете изнова се прикупља у мери у којој је то могуће и измери, нпр. након 4 сата, течна фаза друге кивете након 8 сата, треће кивете након 24 сата, итд.

2. Редна метода – за сваки количински однос земљишта и раствора припремају се највише два узорка. У дефинисаним временским размацима, смеша се центрифугира да би се фазе раздвојиле. Мањи аликвот течне фазе одмах се анализира на присуство испитиване супстанце. Испитивање се наставља са почетном смешом. Ако се након центрифугирања примењује филтрација, лабораторија је адекватно опремљена за поступак филтрације мањих течних аликвота. Да се однос земљишта и раствора не би значајно променио и да би се у току испитивања умањила маса растворене супстанце подложна адсорпцији, препоручује се да запремина узетих аликвота не прелази 1% запремине раствора.

Проценат адсорпције At_i у свакој од временских тачака (t_i) рачуна се на основу почетне номиналне концентрације и концентрације измерене у време узимања узорка (t_i), кориговане на вредност слепе пробе. Криве на којима је At_i приказан у функцији времена (видети Слику 1 у Делу шестом ове методе) цртају се да би се утврдило време у ком је је постигнут плато равнотежног стања[XXII]. Уз то се рачуна и вредност K_d у тренутку достизања равнотежног стања. На основу те вредности се из криве приказане на Слици 1. изаберу адекватни количински односи земљишта и раствора са циљем да проценат адсорпције пређе 20%, а ако је могуће достигне > 50%[61]. Све примењиве једначине и сва начела која важе за цртање кривих, дати су у одељку 2. ове методе, као и у Делу шестом ове методе.

_____

XXII Криве на којима је концентрација испитиване супстанце у воденој фази C_{aq}^{ads} приказана у функцији времена, могу бити коришћене и за процену достизања равнотежног стања (видети Слику 2. у Делу шестом ове методе).

1.9.2.2. Одређивање тренутка у ком је постигнуто равнотежно стање адсорпције и количина супстанце која се адсорбовала у тренутно постизања равотежног стања

Криве At_i или C_{aq}^{ads} у функцији времена омогућавају утврђивање чињенице да је постигнуто равнотежно стање адсорпције, као и количине испитиване супстанце која се адсорбовала у тренутку постизања равнотежног стања. Примери кривих приказани су на Сликама 1. и 2. које су дате у Делу шестом ове методе.

Ако се при експериментисању са одређеном врстом земљишта не дође до платоа, већ се бележи сигуран пораст адсорпције, разлог могу бити фактори који ситуацију чине сложеном, а то су биоразградљивост, односно спора дифузија. Чињеница да је дошло до биоразградљивости може се потврдити понављањем испитивања на стерилисаном узорку земљишта. Ако се ни у том случају не достигне плато, лице које изводи испитивање тражи друге појаве, потенцијално укључене у специфична истраживања која спроводи. То се може урадити одређеним модификацијама испитиваних услова (температуре, трајања протресања, количинског односа земљишта и раствора). Лицу које изводи испитивање препушта се одлука хоће ли наставити испитивање, упркос могућности да не успе да постигне равнотежно стање.

1.9.2.3. Адсорпција на површину посуде за испитивање и стабилност испитиване супстанце

Неки подаци о адсорпцији испитиване супстанце на површину посуде за испитивање, као и о њеној стабилности, могу се добити анализом контролних узорака. Ако се уочи осиромашење садржаја испитиване супстанце веће од стандардне грешке аналитичке методе, могуће је да је то повезано са абиотичком разградњом, односно адсорпцијом на површину посуде за испитивање. Разликовање ове две појаве постиже се темељним прањем зидова посуде познатом запремином прикладног растварача и анализирањем раствора за прање на присуство испитиване супстанце. Ако се не уочи да је на површини посуде за испитивање дошло до адсорпције, овакво осиромашење указује на абиотичку нестабилност испитиване супстанце. Ако је дошло до адсорпције, постојеће посуде за испитивање је потребно заменити онима од другачијег материјала. Подаци о адсорпцији добијени овим испитивањем не могу се са сигурношћу екстраполирати на методу која се тиче количинског односа земљишта и раствора. На ову адсорпцију утиче присуство земљишта.

Додатни подаци о стабилности испитиване супстанце могу се добити одређивањем првобитног масеног баланса, праћеног у току времена. То значи да се течна фаза, екстракти земљишта и зидови посуде за испитивање анализирају на присутност испитиване супстанце. Разлика у маси додате испитиване хемикалије и збира њених хемијских маса у течној фази, екстрактима земљишта и зидовима посуде за испитивање, једнака је разграђеној, односно упареној, односно неекстрахованој маси супстанце. Да би се одредио масени баланс у току испитивања је потребно постићи равнотежно стање адсорпције.

Масени баланс се одређује на земљиштима и за онај количински однос земљишта и раствора који у одређеном типу земљишта доводи до осиромашења садржаја испитиване супстанце за више од 20%, ако је могуће > 50% у равнотежном стању. Када се

испитивање, усмерено на проналажење најповољнијег количинског односа земљишта и раствора који је потребно употребити у главном испитивању, након 48 сати заврши анализом последњег узорка течне фазе, фазе се деле центрифугирањем и по потреби филтрацијом. Течна фаза се поново сакупља у мери у којој је то могуће, а затим се земљишту додаје адекватан екстракциони растварач (коефицијента екстракције од најмање 95%), којим се из тла екстрахује испитивана супстанца. Препоручују се најмање две узастопне екстракције. Затим се одреди количина испитиване супстанце у екстрактима добијеним из земљишта и посуда за испитивање и израчуна масени баланс (једначина 10 у одељку 2. ове методе). Ако количина испитиване супстанце износи мање од 90%, сматра се да ће испитивана супстанца, у току трајања испитивања, бити нестабилна. Истраживања могу да се наставе водећи рачуна о нестабилности испитиване супстанце у овом случају се у оквиру главне студије препоручује анализа обе фазе.

1.9.3. Етапа 2: кинетика адсорпције при јединој концентрацији испитиване супстанце

Користи се пет типова земљишта, изабраних из Табеле 1. Постоји предност у укључивању неких или свих врста земљишта коришћених у оквиру прелиминарне студије у ових пет типова. Земљишта коришћена већ у прелиминарној студији није потребно поново испитивати у етапи 2.

Време потребно да дође до равнотежног стања, количински однос земљишта и раствора, тежина узорка земљишта, запремина течне фазе која је у додиру са земљиштем и концентрација испитиване супстанце у раствору бира се на основу резултата прелиминарне студије. Анализу ако је могуће урадити након 2, 4, 6 или 8 сати (ако је могуће и након 10 сати), као и након 24 сата контакта испитиване супстанце и земљишта. Ако резултати испитивања усмереног на проналажење погодног односа земљишта и раствора покажу да је потребно дуже време да испитивана хемикалија достигне равнотежно стање, време протресања се може продужити на највише 48 сати. При разматрању и састављању временског распореда анализа, могућа је

и одређена флексибилност.

Да би се омогућило утврђивање варијансе резултата, сваки експеримент (један узорак земљишта и један раствора) постави се најмање у дупликату. У оквиру сваког испитивања, анализира се и једна слепа проба. Слепа проба се састоји од земљишта и 0,01 M раствора $CaCl_2$, без испитиване супстанце, при чему су тежина земљишта и запремина раствора заступљени у њој, идентични онима употребљеним у испитиваном узорку. Контролни узорак који се састоји искључиво од испитиване супстанце у 0,01 M раствору $CaCl_2$ (без земљишта), подвргава се идентичном поступку испитивања, чиме се спречавају неочекивани обрти.

Проценат адсорпције рачуна се за сваку од временских тачака At_i, односно временски интервал $A_{\Delta}t_i$ (према потреби), а на кривој се приказује у функцији времена. Рачунају се и коефицијент расподеле (K_d) у равнотежном стању, као и (за неполарне органске хемикалије) адсорпциони коефицијент нормализован на садржај органског угљеника (K_{oc}).

Резултати испитивања кинетике адсорпције

Линеарна K_d вредност тачно описује сорпционо понашање у земљишту[35, 78] и представља израз инхерентне покретљивости хемикалија у земљишту. На пример, хемикалије код којих је $K_d \leq 1 cm^3/g$ сматрају се квалитативно покретљивим. На сличан начин развијена је шема класификације покретљивости базирана на K_{oc} вредностима[16]. Постоје и шеме класификације у односу на процеђивање кроз земљиште, базиране на односу између K_{oc} и DT_{50}[32, 79].

Према резултатима студија у оквиру којих је анализирана грешка[61], K_d вредности ниже од 0,3 cm^3/g не могу се тачно утврдити на основу опадања концентрације испитиване супстанце у течној фази, чак и кад се (што се тачности тиче) примени најпогоднији количински однос земљишта и раствора, тј. 1:1. У овом случају се препоручује анализа обе фазе: земљишта и раствора.

Студију адсорпционог понашања хемикалије у земљишту и њене могуће покретљивости наставити одређивањем Фројндлихових адсорпционих изотерми за ове испитиване системе, за које је могуће тачно одредити K_d, ако се следи доследно испитивани протокол ове методе испитивања. Тачно одређивање истог могуће је ако вредност која се добије множењем K_d са односом земљишта и раствора износи > 0,3 у случају када су мерења заснована на опадању концентрације у течној фази (дакле на индиректној методи) или у случају када се анализирају обе фазе (директном методом)и када вредност износи> 0,1[61].

1.9.4. Етапа 3: Адсорпционе изотерме и кинетика десорпције/десорпцијске изотерме

1.9.4.1. Адсорпционе изотерме

Користи се пет концентрација испитиване супстанце, ако је могуће таквих да покривају два реда величине. При избору ових концентрација потребно је водити рачуна о растворљивости испитиване супстанце у води и њеним крајњим концентрацијама које се у течној фази бележе у тренутку постизања равнотежног стања. Количински однос земљишта и раствора за време целог трајања студије одржавати непромењеним. Испитивање адсорпције обавља се, како је описано, са разликом што се у временском раздобљу потребном да се достигне равнотежно стање, претходно одређено у Етапи 2 испитивања, течна фаза анализира само једном. У раствору се одређују равнотежне концентрације, а количина адсорбоване супстанце израчунава се из осиромашења садржаја испитиване супстанце у раствору, тј. опадања концентрације испитиване супстанце у њој, или директном методом. Адсорбована маса испитиване супстанце по јединици масе земљишта графички се приказује као функција равнотежне концентрације испитиване супстанце (видети одељак 1.2. ове методе).

Резултати испитивања којим се одређују адсорпционе изотерме

Међу до сада предложеним математичким моделима који описују процес адсорпције, најчешће се користи Фројндлихова изотерма. Детаљи у вези тумачења и значаја адсорпционих модела могу се наћи у литетатури[41, 45, 80, 81, 82].

Напомена: поређење вредности K_f (Фројндлихов адсорпциона константа) различитих супстанци могуће је само ако су изражене у истим јединицама мере[83].

1.9.4.2. Кинетика десорпције

Циљ ове методе испитивања јесте да се истражи да ли се хемикалија реверзибилно или иреверзибилно адсорбује на честице земљишта. Ово је важан податак, јер је процес десорпције значајан за понашање хемикалије у природном земљишту. Ако се унесу у базу података, подаци о десорпцији корисни су при компјутерском моделовању у оквиру симулације процеђивања растворене хемикалије из земљишта. Ако се жели извести студија десорпције, препоручује се да се студија дата у овој методи спроведе на сваком систему за који се у претходном испитивању кинетике адсорпције могло тачно одредити K_d.

Слично као и у студији о кинетици адсорпције, испитивање кинетике десорпције могуће је извести на два начина – паралелном и редном методом. Избор методологије која ћа се применити у току студије, препушта се лицу које изводи испитивања, које ће при доношењу одлуке водити рачуна о опремљености доступне лабораторије и средствима која су на располагању.

1. Паралелна метода – за сваку врсту земљишта која је изабрана за студију десорпције, припремају се узорци идентичног количинског односа земљишта и раствора и то у броју који одговара броју временских интервала у којима се проучава кинетика десорпције. Тај број интервала је идентичан броју употребљеном у студији у којој се изучавала кинетика адсорпције. Да би се систему омогућило да достигне тачку равнотежног стања десорпције, укупно трајање испитивања може се

и продужити на примерен начин. У сваком испитивању (један узорак земљишта, један раствора) поставља се и једна слепа проба. Слепа проба се састоји од земљишта и 0,01 M раствора $CaCl_2$ у коме нема испитиване супстанце, при чему су тежина земљишта и запремина раствора идентични онима у испитиваном узорку. За контролни узорак испитивана супстанца се у 0,01 M раствору $CaCl_2$ (без земљишта) испитује по истом поступку. Све смеше земљишта и раствора протресају се довољно дуго док се не достигне равнотежно стање адсорпције (како је то раније утврђено у Етапи 2). Фазе се потом деле центрифугирањем, а течне фазе се уклањају колико је могуће. Уклоњена запремина раствора надомешта се једнаком запремином 0,01 M раствора $CaCl_2$ у коме нема испитиване супстанце, а нове смеше поново се протресају. Течна фаза из прве кивете изнова се прикупља у највећој могућој мери и потом измери након 2 сата, течна фаза из друге кивете након 4 сата, течна фаза из треће кивете након 6 сати, док се не достигне равнотежно стање десорпције.

2. Редна метода – по завршетку студије којом се изучавала кинетика адсорпције, смеша се центрифугира, а течна фаза уклања колико је могуће. Уклоњена запремина раствора надомешта се са 0,01 M раствора $CaCl_2$, без испитиване супстанце. Нова смеша се протреса док се не достигне равнотежно стање десорпције. За то време се смеша у дефинисаним временским интервалима поново центрифугира, да се раздвоје фазе. Мањи аликвот течне фазе потом се анализира на присуство испитиване супстанце. Испитивање се даље наставља са изворном смешом. Запремина сваког појединог аликвота износи мање од 1% укупне запремине. Да би се количински однос земљишта и раствора одржао непромењеним, смеси се додаје стално иста количина свежег 0,01 M раствора CaCl2 и наставља се протресање док не наступи други временски интервал.

Проценат десорпције, према потребама студије, рачуна се за сваку временску тачку (Dt_i), односно временски интервал ($D_{\Delta}t_i$), а на кривој се приказује у функцији времена. Рачуна се и коефицијент десорпције K_d у тренутку достизања равнотежног стања. Све једначине, примењиве у ову сврху, наведене су у одељку 2. ове методе као и у Делу шестом ове методе.

Резултати испитивања којим се изучава кинетика десорпције

Уобичајене криве које приказују проценат десорпције Dt_i и проценат адсорпције At_i у функцији времена, омогућавају утврђивање реверзибилности процеса адсорпције. Ако се достигне равнотежно стање десорпције за време чак двоструко дуже од онога које је било потребно да се достигне равнотежно стање адсорпције, а укупна десорпција прелази 75% укупно адсорбоване количине испитиване супстанце, адсорпција се сматра реверзибилном.

1.9.4.3. Десорпционе изотерме

Фројндлихове десорпционе изотерме одређују се на истим типовима земљишта на којима су се испитивањем одређивале и адсорпционе изотерме. Испитивање десорпције спроводи се на начин описан у одељку 1.9.4.2. ове методе, са једином разликом што се течна фаза анализира само једанпут, у тренутку када се достигне равнотежно стање десорпције. Израчунава се количина десорбоване испитиване супстанце. Садржај испитиване супстанце који је у тренутку достизања равнотежног стања десорпције остао адсорбован на земљиште, графички се приказује као функција равнотежне концентрације испитиване супстанце у раствору (видети одељак 2. ове методе и Део шести ове методе).

2. ПОДАЦИ И ИЗВЕШТАЈ

Подаци добијени анализом приказују се у облику табела (видети Део седми ове методе). Наводе се резултати појединачних мерења и израчунате просечне вредности. Прилажу се графички прикази адсорпционих изотерми. Израчунавања се врше на начин описан у овој методи.

За потребе ове методе, узима се да тежина 1 cm^3 воденог раствора износи 1 g. Количински однос земљишта и раствора може се приказати у јединицама тежинског односа, или односа тежине и запремине истим графиконом.

2.1. АДСОРПЦИЈА

Адсорпција (у даљем тексту: At_i) јесте проценат супстанце адсорбоване на честице земљишта, у односу на количину која је у датим испитиваним условима постојала на почетку испитивања. Уколико је испитивана супстанца постојана и не адсорбује се у значајној мери на зидове посуде, At_i се рачуна за сваку временску тачку t_i према формули:

$$A_{t_i} = \frac{m_s^{ads}(t_i)}{m_0} \times 100\,[\%] \qquad [3]$$

при чему:

At_i јесте проценат адсорпције у тачки времена t_i (%);

m_s^{ads} (t_i) јесте маса (µg) испитиване супстанце адсорбоване на земљиште у времену t_i;

m_0 јесте маса (µg) испитиване супстанце у испитиваној посуди на почетку испитивања.

Израчунавање процента адсорпције At_i у околностима када се примењује паралелна, односно редна метода, дато је у Делу шестом ове методе.

Коефицијент расподеле (K_d) јесте однос између садржаја супстанце у чврстој фази и њене масене концентрације у течној фази, забележен у тренутку у ком је, у датим испитиваним условима, достигнута тачка равнотежног стања адсорпције.

$$K_d = \frac{C_s^{ads}(eq)}{C_{aq}^{ads}(eq)} = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_{aq}^{ads}(eq)} \times \frac{V_0}{m_{земљишта}} [cm^3/g] \quad [4]$$

при чему:

C_s^{ads} јесте садржај (mg/g) супстанце адсорбоване на земљиште у тренутку достизања равнотежног стања адсорпције;

C_{aq}^{ads} јесте масена концентрација(mg/cm^3) супстанце у течној фази у сату достизања равотежног стања адсорпције. Ова концентрација одређена је аналитички, узимајући у обзир вредности забележене анализом слепих проба;

m_{aq}^{ads} јесте маса супстанце адсорбована на земљиште у тренутку достизања равнотежног стања адсорпције (mg);

јесте маса супстанце у раствору у тренутку постизања равнотежног стања адсорпције (mg);

$m_{земљишта}$ јесте количина (g)чврсте фазе, исказана као сува маса земљишта;

V_0 јесте почетна запремина (cm^3)течне фазе која се налази у додиру са земљиштем.

Однос између A_{eq} и K_dдат је формулом:

$$K_d = \frac{A_{eq}}{100 - A_{eq}} \times \frac{V_0}{m_{земљишта}} [cm^3/g] \quad [5]$$

при чему:

A_{eq} јесте проценат (%) адсорпције у тренутку достизања равнотежног стања.

Коефицијент адсорпције нормализован на садржај органског угљеника K_{oc} повезује коефицијент расподеле K_d са садржајем органског угљеника у узорку земљишта:

$$K_{oc} = K_d \times \frac{100}{\%OC} [cm^3/g] \quad [6]$$

при чему:

% OC јесте проценат органског угљеника у узорку земљишта (g/g).

Коефицијент K_{oc} јесте апсолутни број који ближе описује расподелу, нарочито неполарних органских хемикалија, између органског угљеника у земљишту или седимента и воде. Адсорпција ових хемикалија корелира се са садржајем органског угљеника у чврстом сорбенсу[7]. Вредности K_{oc} зависе од специфичних параметара земљишних фракција, које се, због разлика у пореклу, начину настанка, итд. значајно разликују по свом сорптивном капацитету.

2.1.1. Адсорпционе изотерме

Једначина Фројндлихових адсорпционих изотерми повезује количину адсорбоване испитиване супстанце са њеном концентрацијом у раствору у тренутку достизања равнотежног стања (једначина [8]).

Подаци се обрађују у одељку 2.1. ове методе, а за сваку од испитиваних посуда израчуна се садржај испитиване супстанце која се адсорбовала на земљиште по завршетку студије адсорпције C_s^{ads} (eq), на другим местима ознака x/m. Сматра се да је равнотежно стање постигнуто и да C_s^{ads} (eq) представља равнотежну вредност:

$$C_s^{ads}(eq) = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_{земљишта}} = \frac{[C_0 - C_{aq}^{ads}(eq)] \times V_0}{m_{земљишта}} [\mu g/g] \quad [7]$$

Фројндлихова једначина адсорпције дата је у једначини [8]:

$$C_s^{ads}(eq) = K_s^{ads} \times C_{aq}^{ads}(eq)^{1/n} [\mu g/g] \quad [8]$$

или у линеарном облику:

$$\log C_s^{ads}(eq) = \log K_F^{ads} + 1/n \times \log C_{aq}^{ads}(eq) \quad [9]$$

при чему:

K_F^{ads} јесте Фројндлихова константа адсорпције; његова димензија је cm^3/g само ако је 1/n = 1; у свим другим случајевима нагиб 1/n уводи у димензију K_F^{ads} ($\mu g^{1-1/n}$ $(cm^3)^{1/n}$ g^{-1});

n јесте константа регресије; 1/n је углавном унутар опсега 0,7 до 1,0 и сугерише да су подаци о адсорпцији често благо нелинеарни.

Једначине [8] и [9] графички се приказују, а вредности K_F^{ads} и 1/n рачунају се помоћу регресионе анализе, употребом једначине [9]. Рачуна се и коефицијент корелације логаритамске једначине r^2. Пример таквих кривих дат је на слици 2.

Слика 2. Фројндлихова крива адсорпције, нормална и апроксимирана на линеарну

2.1.2. Масени баланс

Масени баланс (mass balance, у даљем тексту: MB) јесте проценат супстанце који се може аналитички детектовати, а остаје након испитивања адсорпције, у односу на номиналну количину супстанце на почетку испитивања.

Ако се растварач може у потпуности помешати са водом, обрада података је другачија. Ако се растварач меша у потпуности са водом, у циљу одређивања количине супстанце која се накнадно може екстраховати растварачем може се применити начин обраде података из одељка 2.2. ове методе. Ако се растварач не меша потпуно са водом, потребно је одредити количину супстанце која се накнадно може детектовати.

MB се при адсорпцији рачуна на следећи начин – подразумева се да назив (m_E) одговара збиру маса испитиване хемикалије, екстраховане из земљишта и са површине посуде за испитивање помоћу органског растварача:

$$MB = \frac{\left(V_{rec} \times C_{aq}^{ads}(eq) + m_E\right) \times 100}{V_0 \times C_0} [\%] \qquad [10]$$

при чему:

MB јесте масени баланс (%);

m_E јесте укупна маса (mg) испитиване супстанце екстрахована из земљишта и са зидова посуде за испитивање у два корака;

C_0 јесте почетна масена концентрација испитиване супстанце која се налази у додиру са земљиштем (mg/cm^3);

V_{rec} јесте запремина (cm^{-3}) супернатанта након достизања равнотежног стања адсорпције.

2.2. ДЕСОРПЦИЈА

Десорпција (у даљем тексту: D) јесте проценат испитиване супстанце који се десорбовао, у односу на количину супстанце која се, у датим испитиваним условима, раније адсорбовала:

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \times 100 [\%] \qquad [11]$$

при чему:

Dt_i јесте проценат десорпције у тачки времена t_i (%);

m_{aq}^{des} (t_i) јесте маса (μg) испитиване супстанце десорбована из земљишта у тачки времена t_i;

m_{aq}^{ads} (eq) јесте маса (μg) испитиване супстанце адсорбована на земљиште у тренутку достизања равнотежног стања адсорпције.

Начин израчунавања постотка десорпције D_{ti}, ако се користе паралелно, односно редна метода, дати су у Делу шестом ове методе.

У датим испитиваним условима видљиви коефицијент десорпције (K_{des}) јесте однос садржаја супстанце који је остао у чврстој фази и масене концентрације десорбоване супстанце у воденом раствору, у тренутку када се достигне равнотежно стање десорпције:

$$K_{des} = \frac{m_s^{ads}(eq) - m_{aq}^{des}(eq) \times V_T}{m_{aq}^{des}(eq)} [cm^3/g] \qquad [12]$$

при чему:

K_{des} јесте коефицијент десорпције (cm^3/g);

m_{aq}^{des} (eq) јесте укупна маса (μg) испитиване супстанце десорбована из земљишта у тренутку достизања равнотежног стања десорпције;

V_T јесте укупна запремина течне фазе који се у току испитивања кинетике десорпције налази у додиру са земљиштем (cm^3).

Смернице за израчунавање m_{aq}^{des} (aq) дате су у одељку 2.2. и у Делу шестом ове методе.

Напомена: Уколико је испитивање адсорпције које претходи овом испитивању изведено паралелном методом, сматра се да је запремина V_T у једначини [12] једнака V_0.

2.2.1. Десорпционе изотерме

Фројндлихова једначина десорпционих изотерми ставља садржај испитиване супстанце који је остао адсорбован на земљиште у однос са концентрацијом испитиване супстанце у раствору у тренутку достизања равнотежног стања десорпције (једначина [16]).

За сваку од кивета у којима се налази испитивани узорак, садржај супстанце који је у тренутку достизања равнотежног стања десорпције остао адсорбован на земљиште рачуна се на следећи начин:

$$C_s^{des}(eq) = \frac{m_s^{ads}(eq) - m_{aq}^{des}(eq)}{m_{земљиште}} [\mu g/g] \qquad [13]$$

m_{aq}^{des} (eq) се дефинише као:

$$m_{aq}^{des}(eq) = m_m^{des}(eq) \times \frac{V_0}{V_r^F} - m_{aq}^{A} [\mu g] \qquad [14]$$

при чему:

C_s^{des} (eq) јесте садржај (μg/g) испитиване супстанце који је у тренутку достизања равнотежног стања десорпције остао адсорбован на земљиште;

m_m^{des} (eq) јесте маса (μg) супстанце, одређена у течној фази у тренутку достизања равнотежног стања десорпције аналитичким путем;

m_{aq}^{A} јесте маса (μg) испитиване супстанце која је због непотпуне замене запремине остала након достизања равнотежног стања адсорпције;

m_{aq}^{des} (eq) јесте маса (μg) супстанце у раствору у тренутку достизања равнотежног стања адсорпције;

$$m_{aq}^{A} = m_{aq}^{ads}(eq) \times \left(\frac{V_0 - V_R}{V_0} \right) \qquad [15]$$

V_r^F јесте запремина раствора узета из посуде за испитивање у циљу мерења у тренутку достизања равнотежног стања десорпције (cm^3);

V_R јесте запремина супернатанта одстрањеног из посуде за испитивање након постизања равнотежног стања адсорбције и замењена истом запремином 0,01 M раствора $CaCl_2$ (cm^3).

Фројндлихова једначина десорпције:

$$C_s^{des}(eq) = K_F^{des} \times C_{aq}^{des}(eq)^{1/n} [\mu g/g] \qquad [16]$$

или у линеарном облику:

$$\log C_s^{des}(eq) = \log K_F^{des} + 1/n \times \log C_{aq}^{des}(eq) \qquad [17]$$

при чему:

K_F^{des} јесте Фројндлиховаконстанта десорпције;

n јесте константа регресије;

m_{aq}^{des} (eq) јесте масена концентрација (mg/cm^3) супстанце у течној фази у тренутку достизања равнотежног стања десорпције.

Једначине [16] и [17] могу се приказати графички, а вредности K и 1/n се рачунају регресионом анализом, коришћењем једначине [17].

Напомена: Уколико Фројндлихов експонент адсорпције, односно десорпције, 1/n, износи 1, Фројндлихова адсорпциона, односно десорпциона константа везивања (K_F^{ads}, односно K_F^{des}) биће једнака константама равнотеже адсорпције, односно десорпције (K_d, односно K_{des}), а криве C_s у односу на C_{aq} биће линеарне. Ако ови експоненти не износе 1, криве C_s у односу на C_{aq} неће бити линеарне, а константе адсорпције, односно десорпције варираће дуж изотерми.

2.2.2. Извештај

Извештај о испитивању садржи:

1) потпуну идентификацију употребљених узорака земљишта, укључујући:

– географске одреднице локације (географску ширину и дужину),

– датум узимања узорака,

– употребљену врсту земљишта (нпр. пољопривредно земљиште, шума, итд.),

– дубину са које је узет узорак,

– садржај песка/муља/иловаче,

– pH вредност (у 0,01 M раствору $CaCl_2$),

– садржај органског угљеника,

– садржај органске материје,

– садржај азота,

– количински однос угљеника и азота (C/N),

– капацитет катјонске измене (mmol/kg);

– све податке који се односе на прикупљање и складиштење узорака земљишта;

2) све податке релевантне за тумачење адсорпције/десорпције испитиване супстанце:

– литературу у којој се наводе методе употребљене за одређивање сваког од показатеља,

– податке о испитиваној супстанци на за то примерен начин,

– температуру при којој се испитивање одвијало,

– услове под којима су узорци центрифугирани,

– аналитички поступак употребљен за анализу испитиване супстанце,

– образложење у ком се аргументују разлози због којих је при припреми основног раствора испитиване супстанце употребљено средство које олакшава растварање и

– уколико је то релевантно, појашњења корекција калкулација;

3) податке у складу са обрасцем (датим у Делуседмом ове методе) и графичке приказе;

4) све податке и запажања који доприносе тумачењу резултата испитивања.

3. ЛИТЕРАТУРА

1. Kukowski H. and Brümmer G., (1987) Investigations on the Adsorption and Desorption of SelectedChemicals in Soils. UBA Report 106 02 045, Part II.

2. Fränzle O., Kuhnt G. and Vetter L., (1987) Selection of Representative Soils in the EC-Territory. UBAReport 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 OECDWorkshop 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 DataReporting, 540/09-88-096, Date: 1/1988.

6. US-Environment Protection Agency: Prevention, Pesticides and Toxic Substances, OPPTS HarmonizedTest Guidelines, Series 835-Fate, Transport and Transformation Test Guidelines, 0PPTS No: 835.1220Sediment 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 (Koc) for anOrganic Chemical in Soil and Sediments.

8. Agriculture Canada: Environmental Chemistry and Fate. Guidelines for registration of pesticides inCanada, 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 ofpesticides 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 Centrefor Agriculture and Forestry, Braunschweig, Germany.

12. Calvet R., (1989) 'Evaluation of adsorption coefficients and the prediction of the mobilities of pesticidesin 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, p. 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, p. 31-44.

15. van Genuchten M. Th., Davidson J.M., and Wierenga P.J., (1974) 'An evaluation of kinetic and equilibriume quations for the prediction of pesticide movement through porous media'. Soil Sci. Soc. Am. Proc., Vol.38(1), p. 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, WashingtonDC.

17. Lambert S.M., Porter P.E., and Schieferrstein R.H., (1965) 'Movement and sorption of chemicals applied tothe soil'. Weeds, 13, p. 185-190.

18. Rhodes R.C., Belasco I.J., and Pease H.L., (1970) 'Determination of mobility and adsorption ofagrochemicals in soils'. J.Agric.Food Chem., 18, p. 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) 'Recommendedapproach to the evaluation of the environmental behavior of pesticides', IUPAC Reports on Pesticides(24). Pure Appl. Chem., 60, p. 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, p. 137-157, BCPC,Surrey, UK.

22. Furminge C.G.L., and Osgerby J.M., (1967) 'Persistence of herbicides in soil'. J. Sci. Food Agric., 18, p.269-273.

23. Burkhard N., and Guth J.A., (1981) 'Chemical hydrolysis of 2-Chloro-4,6-bis(alkylamino)-1,3,5-triazineherbicides and their breakdown in soil under the influence of adsorption'. Pestic. Sci. 12, p. 45-52.

24. Guth J.A., Gerber H.R., and Schlaepfer T., (1977) 'Effect of adsorption, movement and persistence on thebiological availability of soil-applied pesticides'. Proc. Br. Crop Prot. Conf., 3, p. 961-971.

25. Osgerby J.M., (1973) 'Process affecting herbicide action in soil'. Pestic. Sci., 4, p. 247-258.

26. Guth J.A., (1972) 'Adsorptions- und Einwascheverhalten von Pflanzenschutzmitteln in Bцden'. Schr.Reihe Ver. Wass. - Boden-Lufthyg. Berlin-Dahlem, Heft 37, p. 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), p. 135-172, Plenum Press, NY.

28. Helling C.S., (1971) 'Pesticide mobility in soils'. Soil Sci. Soc. Amer. Proc., 35, p. 732-210.

29. Hamaker J.W., (1972) 'Diffusion and volatilization' in Organic chemicals in the soil environment (C.A.I.Goring and J.W. Hamaker eds), Vol. I, p. 49-143.

30. Burkhard N. and Guth J.A., (1981) 'Rate of volatilisation of pesticides from soil surfaces; Comparison ofcalculated results with those determined in a laboratory model system'. Pestic. Sci. 12, p. 37-44.

31. Cohen S.Z., Creeger S.M., Carsel R.F., and Enfield C.G., (1984) 'Potential pesticide contamination ofgroundwater from agricultural uses', in Treatment and Disposal of Pesticide Wastes, p. 297-325, AcsSymp. Ser. 259, American Chemical Society, Washington, DC.

32. Gustafson D.I., (1989) 'Groundwater ubiquity score: a simple method for assessing pesticide leachability'.J. Environ. Toxic. Chem., 8(4), p. 339-357.

33. Leistra M., and Dekkers W.A., (1976) 'Computed effects of adsorption kinetics on pesticide movement insoils'. J. of Soil

Sci., 28, p. 340-350.

34. Bromilov R.H., and Leistra M., (1980) 'Measured and simulated behavior of aldicarb and its oxydationproducts in fallow soils'. Pest. Sci., 11, p. 389-395.

35. Green R.E., and Karickoff S.W., (1990) 'Sorption estimates for modeling', in Pesticides in the SoilEnvironment: Process, Impacts and Modeling (ed. H.H. Cheng). Soil Sci. Soc. Am., Book Series No 2, p.80-101,

36. Lambert S.M., (1967) 'Functional relationship between sorption in soil and chemical structure'. J. Agri.Food Chem., 15, p. 572-576.

37. Hance R.J., (1969) 'An empirical relationship between chemical structure and the sorption of someherbicides by soils'. J. Agri. Food Chem., 17, p. 667-668.

38. Briggs G.G. (1969) 'Molecular structure of herbicides and their sorption by soils'. Nature, 223, p. 1288.

39. Briggs G.G. (1981) 'Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-waterpartition coefficients, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor'. J. Agric. Food Chem.,29, p. 1050-1059.

40. Sabljic A., (1984) 'Predictions of the nature and strength of soil sorption of organic polutance bymolecular topology'. J. Agric. Food Chem., 32, p. 243-246.

41. Bailey G.W., and White J.L., (1970) 'Factors influencing the adsorption, desorption, and movement ofpesticides in soil'. Residue Rev., 32, p. 29-92.

42. Bailey G.W., J.L. White and Y. Rothberg., (1968) 'Adsorption of organic herbicides by montomorillonite:Role of pH and chemical character of adsorbate'. Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 32, p. 222-234.

43. Karickhoff S.W., (1981) 'Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on naturalsediments and soils'. Chemosphere 10, p. 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, p. 1-17.

45. Hamaker J.W., and Thompson J.M., (1972) 'Adsorption in organic chemicals' in Organic Chemicals in theSoil Environment (Goring C.A.I. and Hamaker J.W., eds), Vol I and II, Marcel Dekker, Inc., New York, NY,1972, p. 49-143.

46. Deli J., and Warren G.F., 1971 'Adsorption, desorption and leaching of diphenamid in soils'. Weed Sci.19, p. 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, p. 454-457.

48. Haues M.H.B., Stacey M., and Thompson J.M., (1968) 'Adsorption of s-triazine herbicides by soil organicpreparations' in Isotopes and Radiation in Soil Organic Studies, p. 75, International. Atomic EnergyAgency, Vienna.

49. Pionke H.B., and Deangelis R.J., (1980) 'Methods for distributing pesticide loss in field run-off betweenthe solution and adsorbed phase', CREAMS, in A Field Scale Model for Chemicals, Run-off and Erosionfrom Agricultural Management Systems, Chapter 19, Vol. III: Supporting Documentation, USDAConservation Research report.

50. ISO Standard Compendium Environment: Soil Quality – General aspects; chemical and physicalmethods 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 andcultivated soils.

57. ISO/DIS 10381-5 Soil Quality – Sampling – Part 5: Guidance on the investigation of soilcontamination of urban and industrial sites.

58. ISO 10381-6, 1993: Soil Quality – Sampling – Part 6: Guidance on the collection, handling andstorage 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., p. 109-138.

61. Boesten, J.J.T.I, 'Influence of soil/liquid ratio on the experimental error of sorption coefficients inpesticide/soil system'. Pest. Sci. 1990, 30, p. 31-41.

62. Boesten, J.J.T.I. 'Influence of soil/liquid ratio on the experimental error of sorption coefficients in relationto OECD guideline 106' Proceedings of 5th international workshop on environmental behaviour ofpesticides 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 enfonction de leur structure chimique'. Weed Res. 21, p. 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), p. 382-386.

65. Chiou C.T., Porter P.E., and Schmedding D.W., (1983) 'Partition equilibria of non-ionic organiccompounds between soil organic matter and water'. Environ. Sci. Technol., 17(4), p. 227-231.

66. Gerstl Z., and Mingelgrin U., (1984) 'Sorption of organic substances by soils and sediments'. J. Environm.Sci. Health, B19 (3), p. 297-312.

67. Vowles P.D., and Mantoura R.F.C., (1987), 'Sediment-water partition coefficient and HPLC retentionfactors of aromatic hydrocarbons'. Chemosphere, 16(1), p. 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, WashingtonDC.

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.), p.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-ionicorganic compounds'. Science, Vol. 206, p. 831-832.

71. Hassett J.J., Banwart W.I., Wood S.G., and Means J.C., (1981) 'Sorption of/-Naphtol: implications concerning the limits of hydrophobic sorption'. Soil Sci. Soc. Am. J. 45, p. 38-42.

72. Karickhoff S.W., (1981), 'Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils'. Chemosphere, Vol. 10(8), p. 833-846.

73. Moreale A., van Bladel R., (1981) 'Adsorption de 13 herbicides et insecticides par le sol. Relationsolubilité – reactivité. Revue de l'Agric., 34 (4), p. 319-322.

74. Müller M., Kördel W. (1996) 'Comparison of screening methods for the determination/estimation of adsorption coefficients on soil'. Chemosphere, 32(12), p. 2493-2504.

75. Kördel 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), p. 1373-1384.

76. Kördel W., Stutte J., Kotthoff G. (1993), 'HPLC – screening method for the determination of theadsorption coefficient on soil – comparison of different stationary phases. Chemosphere 27 (12), p.2341-2352.

77. Hance, R.J., (1967), 'The speed of Attainment of Sorption Equilibria in Some Systems Involving Herbicides'. Weed Research, Vol. 7, p. 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 ground water from agricultural uses', in Treatment and Disposal of Pesticide Wastes, p. 297-325, ACSSymp. Ser. 259, American Chemical Society, Washington, DC.

80. Giles C.H., (1970) 'Interpretation and use of sorption isotherms' in Sorption and Transport Processes inSoils. S.C.I. Monograph No. 37, p. 14-32.

81. Giles, C.H.; McEwan J.H.; Nakhwa, S.N. and Smith, D, (1960) 'Studies in adsorption: XI. A system ofclassification of solution adsorption isotherms and its use in the diagnosis of adsorption mechanisms andin measurements of pesticides surface areas of soils'. J. Chem. Soc., p. 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, p. 239-251.

83. Bedbur E., (1996) 'Anomalies in the Freundlich equation', Proc. COST 66 Workshop, Pesticides in soil andthe environment, 13-15 May 1996, Stratford-upon-Avon, U.K.

84. Guth, J.A., (1985) 'Adsorption/desorption', in Joint International Symposium, Physicochemical Propertiesand 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, p. 305 (1962).

Део трећи

УТИЦАЈ ПРЕЦИЗНОСТИ АНАЛИТИЧКЕ МЕТОДЕ И ПРОМЕНА КОНЦЕНТРАЦИЈЕ НА ПРЕЦИЗНОСТ РЕЗУЛТАТА АДСОРБЦИЈЕ

Из следеће табеле[84] јасно је да када је разлика између почетне масе (m_0 = 110 μg) и масе у равнотежном стању (m_{aq}^{ads} (eq) = 100 μg) испитиване супстанце у раствору веома мала, грешка од 5% код мерења концентрације при равнотежном стању резултира грешком од 50%код израчунавања масе супстанце адсорбоване на земљишту (m_{aq}^{ads} (eq)) и 52,4% код израчунавања K_d.

Количина земљишта $m_{земљишта}$ = 10 g

Запремина раствора V_0 = 100 cm^3

	$m_{aq}^{ads}(eq)$ (mg)	$C_{aq}^{ads}(eq)$ (mg/cm³)	R	$m_{aq}^{ads}(eq)^{XXI}$ (mg)	$C_{aq}^{ads}(eq)^{XXI}$ (mg/cm³)	R^{XXI}	K_d^{XXIII}	R'
за A = 9%								
m_0 =110 µg или C_0 = 1,100 µg/cm³	100	1,000	права вредност	10	1,00	права вредност	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%
за A = 55%								
m_0 =110 µg или C_0 = 1,100 µg/cm3	50,0	0,500	права вредност	60,0	6,00	права вредност	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%
за A = 99%								
m_0 =110 µgилиC$_0$ = 1,100 µg/cm³	1,100	0,011	права вредност	108,9	10.89	права вредност	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%

XXIII

$$m_s^{ads} = m_0 - m_{aq}^{ads}(eq),\ C_s^{ads}(eq) = \frac{\left[C_0 - C_s^{ads}(eq)\right] \times V_0}{m_{земљишта}} \times K_d = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_{aq}^{ads}(eq)} \times \frac{V_0}{m_{земљишта}}$$

При чему:

m_s^{ads} (eq) јесте маса испитиване супстанце у земљишној фази у равнотежном стању µg;

m_{aq}^{ads} (eq) јесте маса испитиване супстанце у течној фази у равнотежном стању µg;

C_s^{ads} (eq) јесте садржај испитиване супстанце у земљишној фази у равнотежном стању µg/g;

C_{aq}^{ads} (eq) јесте масена концентрација испитиване супстанце у течној фази у равнотежном стању µg/cm³;

R јесте аналитичка грешка код одређивања m_{aq}^{ads} (eq);

R' јесте израчуната грешка због аналитичке грешке R.

Део четврти
ТЕХНИКЕ ПРОЦЕНЕ K_d

Технике утврђивања омогућавају предвиђање K_d базирано на корелацијама са нпр. вредностима K_{ow}[12, 39, 63-68], подацима о растворљивости испитиване супстанце у води[12, 19, 21, 39, 68-73], односно подацима о поларитету, изведеним из података добијених анализом реверзне фазе помоћу HPLC[74-76]. Како је приказано у Табелама 1. и 2, из ових једначина се израчунава K_{oc} или K_{om}, а потом, индиректно, Kd из једначина:

$$K_{oc} = K_d \times \frac{100}{\%OC}\,[cm^3/g] \qquad K_{om} = \frac{K_d}{1.724} \times \frac{100}{\%OC}\,[cm^3/g]$$

Концепт ових корелација се базира на две претпоставке:

1. органска материја у земљишту доминантно контролише адсорбцију супстанце и

2. интеракције су углавном неполарне.

Као резултат ове корелације:

1. нису или су само у мањој мери примењиве на поларне супстанце и

2. нису примењиве у случајевима када је садржај органске материје у земљишту веома низак[12].

Задовољавајуће корелације пронађене су између P_{ow} и адсорбције[19], али исто се не може тврдити за однос између растворљивости у води и адсорбције[19, 21. Студије] су контрадикторне.

Примери корелација између коефицијента адсорбције и коефицијента расподеле у систему *n*-октанол/вода, као и растворљивости у води дати су у Табелама 1 и 2.

Табела 1: Примери корелације између коефицијента дистрибуције адсорбције и коефицијента расподеле у систему *n*-октанол/вода (остали примери дати су у литератури[12, 68])

Супстанца	Корелација	Аутори
Супституисане урее	$\log K_{om} = 0{,}69 + 0{,}52 \log P_{ow}$	Briggs (1981)[39]
Ароматична хлороване супстанце	$\log K_{oc} = -0{,}779 + 0{,}904 \log P_{ow}$	Chiou et al. (1983)[65]
Различити пестициди	log Ком = 4,4 + 0,72 log P_{ow}	Gerstl и Mingelgrin(1984)[66]
Ароматични угљоводоници	$\log K_{oc} = -2{,}53 + 1{,}15 \log P_{ow}$	Vowles и Mantoura (1987)[67]

Табела 2: Примери корелације између коефицијента дистрибуције адсорбције и растворљивости у води(остали примери дати су у литератури)

Супстанца	Корелација	Аутори
Различити пестициди	$\log K_{om} = 3{,}8 - 0{,}561 \log Sw$	Gerstl и Mingelgrin(1984)[66]
Алифатичне, ароматичне хлороване супстанце	$\log K_{om} = (4{,}040 +/- 0{,}038) - (0{,}557 +/- 0{,}012) \log S_w$	Chiou et al. (1979)[70]
α-нафтол	$\log K_{oc} = 4{,}273 - 0{,}686 \log S_w$	Hasset et al. (1981)[71]
Цикличне, ароматичне, алифатичне супстанце	$\log K_{oc} = -1{,}405 - 0{,}921 \log S_w$ $- 0{,}00953 (mp - 25)$	Karickhoff (1981)[72]
Различита једињења	$\log K_{om} = 2{,}75 - 0{,}45 \log S_w$	Moreale van Blade (1982)[73]

Део пети
ИЗРАЧУНАВАЊА ЗА ДЕФИНИСАЊЕ УСЛОВА ЦЕНТРИФУГИРАЊА

1. Трајање центрифугирања дато је следећом формулом, уз претпоставку о сферним честицама:

$$t = \frac{9}{2}\left[\frac{\eta}{\omega^2 r p^2 (\rho_s - \rho_{aq})}\right] \ln \frac{R_b}{R_t} \qquad [1]$$

при чему:

ω јесте ротациона брзина (= 2 п rpm/60), (rad/s);

rpm јесу обртаји у минути;

η јесте вискозитет раствора, (g/s cm^{-1});

r_p јесте пречник честице, (cm);

ρ_s јесте густина земљишта, (g/cm^3);

ρ_{aq} јесте густина раствора, (g/cm^3);

R_t јесте удаљеност од центра ротора центрифуге до врха раствора у кивети, (cm);

R_b јесте удаљеност од центра ротора центрифуге до дна раствора у кивети, (cm);

$R_b - R_t$ јесте висина стуба смеше земљиште/раствор у кивети, (cm).

Због поједностављења параметри су описани у јединицама које нису SI јединице (g, cm).

Општеприхваћено је да се израчунато време дуплира да би се обезбедило комплетно раздвајање.

2. Једначина [1] може се поједноставити ако се узме у обзир да су вискозитет (η) и густина (ρaq) раствора једнаке вискозитету и густини воде на 25°C; следи η = 8,95 Í 10^{-3} g/scm^{-1} и ρaq = 1,0 g/cm^3.

Време цетрифугирања је:

$$t = \frac{3{,}7}{(\mathrm{rpm})^2 \times r_p^2(\rho_s - 1)} \ln \frac{R_b}{R_t} \quad [2]$$

3. Из једначине [2] постаје јасно да су за дефинисање услова центрифугирања, тј. њеног трајања (t) и брзине (rpm), потребних за раздвајање честица специфичне величине (у нашем случају пречника 0,1 μм), важна два параметра:

– густина земљишта и

– висина стуба смеше у кивети за центрифугирање (R_b – R_t), тј. удаљеност од врха нивоа раствора до дна кивете на којој се честица протеже; ако је запремина фиксна, висина стуба смеше у кивети ће очигледно зависити од квадрата њеног пречника.

Слика 1 приказује варијације у дужини трајања центрифугирања (t) у односу на брзину центрифугирања (rpm), при различитим густинама земљишта (ρ_s) (Слика 1а) и различитим висинама стуба смеше у киветама за центрифугирање (Слика 1б). Из Слике 1а следи да је утицај густине земљишта очигледан. На пример, при класичном центрифугирању узорка земљишта густине 1,2 g cm^3, брзином од 3.000 обртаја у минути, центрифугирање траје приближно 240 минута, док центрифугирање земљишта густине 2,0 g cm^3 траје свега 50 минута. На сличан начин, из Слике 1б следи да ако висина стуба смеше у кивети износи 10 cm, класично центрифугирање брзином од 3.000 обртаја у минути траје приближно 50 минута, а ако та висина износи 1 cm, само 7 минута. Важно је наћи оптималан однос између центрифугирања које изискује најмању могућу висину стуба смеше у кивети и једноставне лабораторијске обраде у тренутку када лице које изводи испитивања, након центрифугирања, раздели фазе.

4. Када се дефинишу испитивани услови под којима ће се разделити чврста фаза (земљиште) од течне фазе (раствор), важно је узети у обзир могућност постојања треће, „псеудо – фазе", колоида. Ове честице, мање од 0,2 μм, могу имати важан утицај на целокупни механизам адсорпције супстанце у суспензији земљишта. Ако се центрифугира на описани начин, колоиди се задржавају у течној фази и анализирани заједно са њом. Овим се подаци о њиховом утицају губе.

Ако лабораторија која изводи студију располаже опремом која омогућује ултрацентрифугирање или ултрафилтрацију, адсорпција/десорпција се може проучавати детаљније, што укључује и могућност добијања података о адсорпцији испитиване супстанце на колоиде. У овом случају, у циљу раздељивања три фазе (земљишта, колоида и раствора) потребно је извршити ултрацентрифугирање брзином од 60.000 окретаја/мин, односно ултрафилтрацију филтром порозности од 100.000 Далтона. У складу са тим, да би се анализи на присуство супстанце подвргле све три фазе, потребно је адекватно променити и протокол методе испитивања.

Слика 1а.

Варијације времена центрифугирања (t) у односу на брзину центрифуге (рпм) за земљишта различите густине (ρ_s). R_t = 10 cm, R_b – R_t = 10 cm, η = 8,95 × 10^{-3} g/scm^{-1} и ρ_{aq} = 1,0 g/cm^3 на 25°C.

Слика 1б.

Варијације времена центрифугирања (t) у односу на брзину центрифуге (rpm) за различите висине стуба смеше у кивети (R_b – R_t) = L; R_t = 10 cm, η = 8,95 × 10-3 g/s cm^{-1}, ρ_{aq} = 1,0 g/cm^3 на 25°C и ρ_s = 2,0 g/cm^3.

Део шести
ИЗРАЧУНАВАЊЕ АДСОРПЦИЈЕ A (%) И ДЕСОРПЦИЈЕ D (%)

Временска скала поступка је:

За сва израчунавања подразумева се да је испитивана супстанца стабилна и да се не адсорбује значајно на зидове посуде.

АДСОРПЦИЈА A (%)

Паралелна метода

Проценат адсорпције рачуна се за сваку испитивану посуду у којој се налази испитивани узорак (i), и то у свакој од временских тачака (t_i), према једначини:

$$A_n = \frac{m_s^{ads}(t_i) \times 100}{m_0} [\%] \qquad [1]$$

Услови из ове једначине могу се израчунати на следећи начин:

$$m_0 = C_0 \times V_0 [\mu g] \qquad [2]$$

$$m_s^{ab}(t_i) = m_0 - C_{aq}^{ab}(t_i) \times V_0 [\mu g] \qquad [3]$$

при чему:

At_i јесте проценат адсорпције (%) у тачки времена t_i;

m_s^{ads} (t_i) јесте маса (mg) испитиване супстанце у земљишту у времену t_i када је анализа обављена;

m_0 јесте маса (mg) испитиване супстанце у испитиваној посуди са испитиваном узорком, на почетку испитивања;

C_0 јесте почетна масена концентрација (mg/cm^3) испитиваног раствора која се налази у додиру са земљиштем;

$C_{s_3}^{ads}$ (t_i) јесте масена концентрација испитиване супстанце у течној фази у времену ти у ком је рађена анализа (mg/cm^3); ова концентрација одређена је аналитички узимајући у обзир вредности добијене у слепим пробама;

V_0 јесте почетна запремина испитиваном раствора који се налази у додиру са земљиштем (cm^3).

Вредности процента адсорпције At_i или C_s^{ads} (t_i) графички су приказани у функцији времена, па се одређује време потребно да се достигне равнотежно стање адсорпције. Примери кривих дати су на Слици 1, односно Слици 2.

Слика 1. Графички приказ равнотежног стања адсорбције

Слика 2. Масене концентрације испитиване супстанци у течној фази (C_{aq}) у функцији времена

Редна метода

Следеће једначине узимају у обзир да се адсорбција прати мерењем испитиване супстанце у малим аликвотима течне фазе у дефинисаним временским интервалима.

Током сваког временског интервала количина супстанце која се адсорбује на земљиште рачуна се као:

– за први интервал времена $\Delta t_1 = t_1 - t_0$

$$m_s^{ads}(\Delta t_1) = m_0 - m_m^{ads}(t_1) \times \left(\frac{V_0}{v_a^A}\right) \quad [4]$$

– за други временски интервал $\Delta t_2 = t_2 - t_1$

$$m_s^{ads}(\Delta t_2) = m_m^{ads}(t_1) \times \left(\frac{V_0}{v_a^A}\right) - m_m^{ads}(t_2) \times \left(\frac{V_0 - v_a^A}{v_a^A}\right) \quad [5]$$

– за трећи временски интервал $\Delta t_3 = t_3 - t_2$

$$m_s^{ads}(\Delta t_3) = m_m^{ads}(t_2) \times \left(\frac{V_0 - v_a^A}{v_a^A}\right) - m_m^{ads}(t_3) \times \left(\frac{V_0 - 2 \times v_a^A}{v_a^A}\right) \quad [6]$$

– за *n*-ти интервал $\Delta tn = t_n - t_{n-1}$

$$m_s^{ads}(\Delta t_n) = m_m^{ads}(t_{n-1}) \times \left(\frac{V_0 - (n-2) \times v_a^A}{v_a^A}\right) - m_m^{ads}(t_n) \times \left(\frac{V_0 - (n-1) \times v_a^A}{v_a^A}\right) \quad [7]$$

Проценат адсорпције у сваком временском интервалу $A_{\Delta}t_i$ рачуна се према формули:

$$A_{t_i} = \frac{m_s^{ads}(\Delta t_i)}{m_0} \times 100 [\%] \quad [8]$$

Док се проценат адсорпције (At_i) у тачки времена t_i рачуна формулом:

$$A_{t_i} = \frac{\sum_{j=\Delta t_1}^{\Delta t_i} m_s^{ads}(j)}{m_0} \times 100\,[\%] \qquad [9]$$

Вредности адсорпције At_i или $A_D t_i$(у зависности од потреба студије) графички се приказују у функцији времена, а одређује се време након достизања равнотежног стања адсорбције.

У тренутку достизања равнотежног стања t_{eq}:

– маса испитиване супстанце адсорбована на земљиште је:

$$m_s^{ads}(eq) = \sum_{\Delta t_i=1}^{n} m_s^{ads}(\Delta t_i) \qquad [10]$$

– маса испитиване супстанце у раствору је:

$$m_{aq}^{ads}(eq) = m_0 - \sum_{\Delta t_i=1}^{n} m_s^{ads}(\Delta t_i) \qquad [11]$$

– проценат адсорбције у равнотежном стању је:

$$A_{eq} = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_0} \times 100\,[\%] \qquad [12]$$

при чему наведени параметри:

m_s^{ads} (Δt_1), m_s^{ads} (Δt_2)...m_s^{ads} (Δt_n), јесу маса (μg) супстанце адсорбоване на земљиште у току временских интервала Δt_1, Δt_2... Δt_n;

m_m^{ads} (Δt_1), m_m^{ads} (Δt_2)...m_m^{ads} (Δt_n), јесу маса (μg) супстанце измерена у аликвоту V_a^A у тачкама времена t_1, t_2... t_n;

m_s^{ads} (eq) јесте маса супстанце адсорбована на земљиште у равнотежном стању адсорбције (μg);

m_{aq}^{ads} (eq) јесте маса супстанце у раствору у равнотежном стању адсорбције (μg);

V_a^A јесте запремина аликвота у коме је мерена испитиване супстанца (cm^3);

$A\Delta t_i$ јесте проценат адсорпције у временском интервалу Δt_i (%);

A_{eq} јесте проценат адсорпције у равнотежном стању адсорбције(%).

ДЕСОРПЦИЈА D (%)

Почетно време (t_0) испитивања кинетике десорпције, сматра се за тренутак (након постизања равнотежног стања адсорпције) у ком је највећа запремина раствора испитиване супстанце замењена једнаком запремином 0,01 M раствора $CaCl_2$.

Паралелна метода

У времену t_i маса испитиване супстанце у течној фази мери се из *i*-те кивете v_r^i а десорбована маса рачуна се формулом:

$$m_{aq}^{des}(t_i) = m_m^{des}(t_i) \times \left(\frac{V_0}{v_r^i}\right) - m_{aq}^{A} \qquad [13]$$

У тренутку достизања равнотежног стања десорпције $t_i = t_{eq}$, па је m_{aq}^{des} (t_1) = m_{aq}^{des} (eq).

Маса испитиване супстанце десорбована у току временског интервала (Δt_i) је:

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_i) = m_{aq}^{des}(t_i) - \sum_{j=1}^{i=1} m_{aq}^{des}(j) \qquad [14]$$

Проценат десорпције се рачуна:

– у тачки времена t_i из формуле:

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \times 100\,[\%] \qquad [15]$$

– у току временског интервала (Dt_i) из формуле:

$$D_{\Delta t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(\Delta t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \times 100\,[\%] \qquad [16]$$

при чему:

Dt_i јесте проценат (%) десорпције у тачки времена t_i;

$D\Delta t_i$ јесте проценат (%) десорпције који одговара временском интервалу Dt_i;

m_{aq}^{des} (t_i) јесте маса (mg) испитиване супстанце десорбована у тачки времена t_i;

m_{aq}^{des} (Δt_i) јесте маса (mg) испитиване супстанце десорбована у току временског интервала Δt_i

m_m^{des} (t_i) јесте маса (mg) испитиване супстанце аналитички измерена у тачки времена t_i у раствору запремине v_r^i која је узета за анализу;

m_{aq}^{A} јесте маса (mg) испитиване супстанце која преостаје након достизања равнотежног стања адсорбције због некомплетне измене запремине;

$$m_{aq}^{A} = m_{aq}^{ads}(eq) \times \left(\frac{V_0 - V_R}{V_0}\right) \qquad [17]$$

m_{aq}^{ads} (eq) јесте маса (mg) испитиване супстанце у раствору у тренутку достизања равнотежног стања адсорбције;

V_R јесте запремина супернатанта уклоњена након постизања равнотежног стања адсорбције и замењена истом запремином 0,01 M раствора $CaCl_2$ (cm^3);

v_r^i јесте запремина (cm^3) раствора узетог из *i*-текивете за мерење испитиване супстанце, у експерименту кинетике десорпције.

Вредности десорпције Dt_i и DDt_i (у складу са потребама студије) графички се приказују у функцији времена и одређује се време након којег се достиже равнотежно стање десорпције.

Редна метода

Једначине дате у овом одељку узимају у обзир да је протокол испитивања адсорбције који је претходио овоме, подразумевао мерење испитиване супстанце у малим аликвотима (v_r^i) течне фазе (видети у одељку 1.9. ове методе). Подразумева се да је:

1. запремина супернатанта, уклоњеног из епрувете након испитивања којим се проучавала кинетика адсорпције, замењен једнаком запремином 0,01 M раствора $CaCl_2$ (V_R) и да је

2. укупна запремина течне фазе која је у додиру са земљиштем (V_T) у току испитивања којим се проучава кинетика десорпције остала непромењена и дата формулом:

$$V_T = V_0 - \sum_{i=1}^{n} v_a^A(i) \qquad [18]$$

У тренутку t_i:

– маса испитиване супстанце мери се у малим аликвотима (v_a^D), а десорбована маса се рачуна применом формуле:

$$m_{aq}^{des}(t_i) = m_m^{des}(t_i) \times \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^{A} \times \left(\frac{V_T - (i-1) \times v_a^D}{V_T}\right) \qquad [19]$$

– у моменту достизања равнотежног стања десорпције $t_i = t_{eq}$, па је m_{aq}^{des} (t_1) = m_{aq}^{des} (eq);

– проценат десорпције D_t рачуна се из следеће формуле:

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \times 100\,[\%] \qquad [20]$$

У временском интервалу (Δt_i):

– за први временски интервал $\Delta t_1 = t_1 - t_0$, количина десорбоване супстанце је:

$$m_{aq}^{des}(\Delta\Delta_1) = m_m^{des}(t_1) \times \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^{A} \text{ и } m_s^{des}(t_1) = m_s^{aq}(eq) - m_{aq}^{des}(\Delta t_1) \quad [21]$$

– за други временски интервал $\Delta t_2 = t_2 - t_1$, количина десорбоване супстанце је:

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_2) = m_m^{des}(t_2)\times\left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^{des}(\Delta t_1)\times\left(\frac{V_T - v_a^D}{V_T}\right) - m_{aq}^{A}\times\left(\frac{V_T - v_a^D}{V_T}\right) \text{ и}$$

$$m_s^{des}(t_2) = m_s^{ads}(eq) - \left[m_{aq}^{des}(\Delta t_1) + m_{aq}^{des}(\Delta t_2)\right] \quad [22]$$

– за *n*-ти временски интервал $\Delta t_n = t_n - t_{n-1}$, количина десорбоване супстанце је:

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_n) = \left[m_m^{des}(t_n)\times\left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^{A}\times\left(\frac{V_T - (n-1)\times v_a^D}{V_T}\right) - \sum_{i=1,n\neq 1}^{n-1}\left(\frac{V_T - (n-i)\times v_a^D}{v_a^A}\times m_{aq}^{des}(\Delta t_i)\right)\right] \text{ и}$$

$$m_s^{des}(t_n) = m_s^{ads}(eq) - \sum_{i=1,n\neq 1}^{n} m_{aq}^{des}(\Delta t_i) \quad [23]$$

На крају, проценат десорпције у сваком временском интервалу $D\Delta t_i$ се рачуна помоћу следеће формуле:

$$D_{\Delta t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(\Delta t_i)}{m_s^{ads}(eq)}\times 100\,[\%] \quad [24]$$

Проценат десорпције у времену t_i је:

$$D_{t_i} = \frac{\sum_{j=\Delta t_1}^{\Delta t_i} m_{aq}^{des}(j)}{m_s^{ads}(eq)}\times 100 = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)}\times 100\,[\%] \quad [25]$$

при чему наведени параметри:

$m_s^{des}(\Delta t_1)$, $m_s^{des}(\Delta t_2)$...$m_s^{des}(\Delta t_n)$, јесу маса (mg)супстанце која остаје адсорбована на земљишту након временских интервала Δt_1, Δt_2... Δt_n;

$m_{aq}^{des}(\Delta t_1)$, $m_{aq}^{des}(\Delta t_2)$...$m_{aq}^{des}(\Delta t_n)$, јесу маса(mg) испитиване супстанце десорбована у току временских интервала Δt_1, Δt_2... Δt_n;

$m_m^{des}(\Delta t_1)$, $m_m^{des}(\Delta t_2)$...$m_m^{des}(\Delta t_n)$, јесу маса (mg) супстанце измерена у аликвотима у тачкама времена t_1, t_2... t_n;

V_T јесте укупна запремина течне фазе у контакту са земљиштем у току испитивања кинетике десорпције изведеног редном методом (cm^3);

m_{aq}^{A} јесте маса (mg) испитиване супстанце која остаје након достизања равнотежног стања адсорбције због некомплетне измене запремине;

$$m_{aq}^{A} = \left(\frac{\left(V_0 - \sum_{i=1}^{n} v_a^A(i)\right) - V_R}{V_0 - \sum_{i=1}^{n} v_a^A(i)}\right)\times m_{aq}^{ads}(eq) \quad [26]$$

V_R јесте запремина супернатанта уклоњена из епрувете након постизања равнотежног стања адсорбције и замењена истом запремином 0,01 M раствора $CaCl_2$ (cm^3);

v_a^D јесте запремина (cm^3) аликвота узетог из *i*-те епрувете за анализу у току испитивања кинетике десорпције изведеног редном методом;

$$v_a^D \leq 0{,}02\times V_T \quad [27]$$

Део седми

АДСОРПЦИЈА – ДЕСОРПЦИЈА У ЗЕМЉИШТУ: ФОРМУЛАРИ ЗА ИЗВЕШТАЈ

Испитивана супстанца:

Испитивано земљиште:

Садржај суве масе земљишта (105° C, 12 сати):……..... %

Температура:..... °C

ПРИКЛАДНОСТ АНАЛИТИЧКЕ МЕТОДЕ

Тежина земљишта	g	
Земљиште: сува маса	g	
Запремина $CaCl_2$сол.	cm^3	
Номинална концентрација финалног раствор	$\mu g/cm^3$	
Аналитичка концентрација финалног раствор	$\mu g/cm^3$	

Принцип коришћене аналитичке методе:

Калибрација аналитичке методе:

Испитивана супстанца:

Испитивано земљиште:

Садржај суве масе земљишта (105°C, 12 сати):……..... %

Температура:.....……..... °C

Праћена аналитичка методологија: Индиректна ☐ Паралелна ☐ Редна ☐

Директна ☐

Метода испитивања адсорпције: испитивани узорци

	Симбол	Јединица мере	Време достизања равно-тежног стања		Време достизања равно-тежног стања		Време достизања равно-тежног стања		Време достизања равно-тежног стања	
Епрувета бр.										
Тежина земљишта	—	g								
Земљиште: сува маса	$m_{земљишта}$	g								
Запремина воде у изваганом земљишту (израчуната)	V_{WS}	cm^3								
Запремина 0,01 M $CaCl_2$ раствора за равнотежу земљишта		cm^3								
Запремина основног раствора		cm^3								
Укупна запремина течне фазе у додиру са земљиштем	V_0	cm^3								
Почетна концентра-ција испитиваног раствора	C_0	$\mu g/cm^3$								
Маса испитиване супстанце на почетку испитивања	m_0	µg								

Након мешања и центрифугирања										
ИНДИРЕКТНА МЕТОДА										
Паралелна метода										
Концентрација испитиване супстанце у течној фази (укључујући и слепу пробу)	$C_{aq}^{ads}(t_i)$	$\mu g/cm^3$								
Редна метода										
Измерена маса испитиване супстанце у аликвотима v_a^A	$m_a^{ads}(t_i)$	µg								
ДИРЕКТНА МЕТОДА										
Маса испитиване супстанце адсорбоване на земљиште	$m_s^{ads}(t_i)$	µg								
Израчунавање адсорпције										
Адсорпција	At_i	%								
	$A_{\Delta t_i}$	%								
Средња вредност										
Константа адсорпције	K_d	cm^3/g								
Средња вредност										
Константа адсорпције	K_{oc}	cm^3/g								
Средња вредност										

Испитивана супстанца:

Испитивано земљиште:

Садржај суве масе земљишта (105°C, 12 сати):…….....….%

Температура:…….....……..... °C

Метода испитивања адсорпције: слепе пробе и контролни узорци

	Симбол	Јединица мере	Слепа проба		Слепа проба		Контрола	
Епрувета бр.								
Тежина земљишта		g					0	0
Садржај воде у измереном земљишту (израчунато)		cm^3						
Додата запремина 0,01 M раствора$CaCl_2$		cm^3						
Додата запремина основног раствора испитиване супстанце		cm^3	0	0				
Укупна запремина течне фазе (израчунато)		cm^3					—	—
Почетна концентрација испитиване супстанце у течној фази		cm^3						
Након мешања и центрифугирања								
Концентрација у течној фази		$\mu g/cm^3$						

Напомена: Ако је потребно додати колоне.

Испитивана супстанца:

Испитивано земљиште:

Садржај суве масе земљишта (105° C, 12 сати):…….....….%

Температура:…….....……..... °C

Масени баланс

	Симбол	Јединица мере				
Епрувета бр.						
Тежина земљишта	—	g				
Земљиште: сува маса	$m_{земљишта}$	g				
Запремина воде у одмереном земљишту (израчунато) Запремина 0,01 M раствора $CaCl_2$ за уравнотежење земљишта	V_{WS}	ml ml				
Запремина основног раствора		cm^3				
Укупна запремина течне фазе у контакту са земљиштем	V_0	cm^3				
Почетна концентрација испитиваног раствора	C_0	$\mu g/cm^3$				
Време достизања равнотежног стања	—	h				
Након мешања и центрифугирања						
Концентрација испитиване супстанце у течној фази у тренутку достизања равнотежног стања укључујући корекцију за слепу пробу	C_{eq}^{ads} (eq)	$\mu g/cm^3$				
Време достизања равнотежног стања	t_{eq}	h				
Прво разблаживање са растварачем						
Уклоњена запремина течне фазе	V_{rec}	cm^3				
Додата запремина растварача	ΔV	cm^3				
Прва екстракција растварачем						
Сигнал анализиран у растварачу	S_{E1}	вар.				
Концентрација испитиване супстанце у растварачу	C_{E1}	$\mu g/cm^3$				

Маса супстанце екстраховане из земљишта и са зидова Испитивања посуда	m_{E1}	µg				
Друго разблаживање са растварачем						
Уклоњена запремина течне фазе	ΔV_s	cm^3				
Додата запремина растварача	$\Delta V'$	cm^3				
Друга екстракција растварачем						
Сигнал анализиран у растварачу	S_{E2}	вар.				
Концентрација испитиване супстанце у растварачу	C_{E2}	$\mu g/cm^3$				
Маса супстанце екстраховане из земљишта и са зидова Испитивања посуда	m_{E2}	µg				
Укупна маса испитиване супстанце екстрахована у два корака	m_E	µg				
Масени баланс	MB	%				

Испитивана супстанца:

Испитивано земљиште:

Садржај суве масе земљишта (105° C, 12 сати):…….....….%

Температура:…….....……..... °C

Адсорпционе изотерме

	Симбол	Јединица мере						
Епрувета бр.								
Тежина земљишта	—	g						
Земљиште: сува маса	E	g						
Садржај воде у измереном земљишту (израчунато)	V_{WS}	cm^3						
Додата запремина 0,01 M раствора $CaCl_2$		cm^3						
Додата запремина основног раствора испитиване супстанце		cm^3	0	0				
Укупна запремина течне фазе (израчунато)	V_0	cm^3						
Концентрација раствора	C_0	cm^3						
Време за достизање равнотежног стања	—	h						
Након мешања и центрифугирања								
Концентрација супстанце у течној фази укључујући и корекцију на слепу пробу	$C_{aq}^{ads}(eq)$	$\mu g/cm^3$						
Температура		°C						
Адсорбована маса по јединици земљишта	$C_s^{ads}(eq)$	$\mu g/cm^3$						

Регресиона анализа:

Вредност K_F^{ads}:

Вредност 1/n:

Регресиони коефицијент r^2:

Испитивана супстанца:

Испитивано земљиште:

Садржај суве масе земљишта (105 °C, 12 сати):…….....….%

Температура:…….....……..... °C

Праћена аналитичка методологија: Индиректна ☐ Паралелна ☐ Редна ☐

Испитивање десорпције

		Симбол	Јединица мере	Временски интервал	Временски интервал	Временски интервал	Временски интервал
Епрувета бр. (из адсорционог корака)							
Маса супстанце адсорбована на земљиште у тренутку достизања равнотежног стања		$m_s^{ads}(eq)$	μg				
Уклоњена запремина течне фазе, замењена 0,01 M раствором $CaCl_2$		V_R	cm^3				
Укупна запремина течне фазе у контакту са земљиштем	PM SM	V_0 V_T	cm^3 cm^3				

Маса испитиване супстанце заостала након достизања равнотежног стања адсорбције услед некомплетне измене запремине	m_{eq}^{A}	µg				
Кинетика десорпције						
Измерена маса супстанце десорбована у времену t_i	$m_{m}^{des}(t_i)$	µg				
Запремина раствора узетог из кивете (и) за мерење испитиване супстанце PM	v_r^i	cm^3				
Запремина раствора узетог из кивете (и) за мерење испитиване супстанце SM	v_a^D	cm^3				
Маса супстанце десорбоване са земљишта у времену ти (израчунато)	$m_{aq}^{des}(t_i)$	µg				
Маса супстанце десорбоване са земљишта у временском интервалуΔти (израчунато)	$m_{aq}^{des}(\Delta t_i)$	µg				
Проценат десорпције						
Десорпција у времену t_i	Dt_i	%				
Десорпција у временском интервалу Δt_i	$D_{\Delta t_i}$	%				
Привидни коефицијент десорпције	K_{des}					

PM: паралелна метода

SM: редна метода

C.19. ОДРЕЂИВАЊЕ КОЕФИЦИЈЕНТА АДСОРПЦИЈЕ (K_{oc}) НА ЗЕМЉИШТУ И ОТПАДНОМ МУЉУ УПОТРЕБОМ ТЕЧНЕ ХРОМАТОГРАФИЈЕ ВИСОКИХ ПЕРФОРМАНСИ (HPLC)

Део први

1. МЕТОДА ИСПИТИВАЊА

Метода се заснива на Упутству за испитивање OECD 121 (2000).

1.1. УВОД

Адсорпционо понашање супстанци у земљишту, односно отпадним муљевима, описују параметри који се одређују методом испитивања C.18. која је дата у овом прилогу. Важан параметар је адсорпциони коефицијент који се дефинише као однос између концентрације супстанце у земљишту/муљу и концентрације супстанце у воденој фази у равнотежном стању адсорпције. Коефицијент адсорпције нормализован на садржај органског угљеника у земљишту (у даљем тексту: K_{oc}) користан је показатељ капацитета везивања хемикалије за органску материју земљишта односно отпадног муља и омогућује међусобно поређење различитих хемикалија. Овај параметар се може утврдити путем корелација са растворљивошћу супстанце у води и њеним коефицијентом расподеле у систему *n*-октанол/вода[1, 2, 3, 4, 5, 6, 7].

За утврђивање коефицијента адсорпције у земљишту и отпадном муљу, користи се течна хроматографија високих

перформанси (у даљем тексту: HPLC[8]). Ове процене су поузданије од оних добијених QSAR израчунавањима[9]. Као метода која служи за процену, она не може у потпуности да замени студије равнотежног стања изметоде C.18. која је дата у овом прилогу. Утврђени K_{oc} може бити од користи при избору адекватних параметара за испитивање адсорпције/десорпције према методи C.18. Применом једначине [3] (видети одељак 1.2. ове методе) израчунава се коефицијент расподеле, односно Фројндлихова константа адсорпције.

1.2. ДЕФИНИЦИЈЕ

Коефицијент расподеле (у даљем тексту: K_d)јесте однос између равнотежних концентрација (C) испитиване супстанце, растворене у двофазном систему који се састоји од сорбенса (земљиште или отпадни муљ) и водене фазе. Уколико се концентрације у обе фазе искажу као тежински однос, ова вредност је број без јединице мере. Ако се концентрација у воденој фази исказује као однос тежине и запремине, јединице у којима ће бити исказан K_d су ml/g. K_d може варирати у зависности од сорпцијских својстава и зависи од концентрације.

$$K_d = \frac{C_{земљишта}}{C_{aq}} \quad \text{или} \quad \frac{C_{муља}}{C_{aq}} \qquad [1]$$

при чему:

$C_{земљишта}$ јесте концентрација (mg/g) испитиване супстанце у земљишту у тренутку достизања равнотежног стања;

$C_{муља}$ јесте концентрација (mg/g) испитиване супстанце у муљу у тренутку достизања равнотежног стања;

C_{aq} јесте концентрација (mg/g, mg/ml) испитиване супстанце у воденој фази у тренутку достизања равнотежног стања.

Фројндлихова константа адсорпције (у даљем тексту: K_f) јесте концентрација испитиване супстанце у земљишту, односно отпадном муљу (x/m) у тренутку када равнотежна концентрација C_{aq} у воденој фази износи један. K_f се изражава у mg/g сорбенса. У зависности од својстава сорбенса, његова вредност може варирати.

$$\log\frac{x}{m} = \log K_f + \frac{1}{n}\log C_{aq} \qquad [2]$$

При чему:

x/m јесте количина испитиване супстанце x (µg), адсорбоване на количину сорбенса m (g) у тренутку достизања равнотежног стања;

1/n јесте нагиб Фројндлихове адсорпционе изотерме;

C_{aq} јесте концентрација (mg/g) испитиване супстанце у воденој фази у тренутку достизања равнотежног стања.

$$\text{At} C_{aq} = 1; \quad \log K_f = \log\frac{x}{m}$$

Коефицијент адсорпције (у даљем тексту: K_{oc}) јесте нормализован K_d, односно K_f, на садржај органског угљеника (f_{oc}) у сорбенсу. K_{oc} јепосебно у случају нејонизованих хемикалија, приближни показатељ обима адсорпције између супстанце и сорбенса и омогућава међусобно поређење различитих хемикалија. У зависности од величине K_d и K_f, K_{oc} може бити број без јединице мере или може бити исказан у ml/g или у mg/g органске материје.

$$K_{oc} = \frac{K_d}{f_{oc}}\left[\text{без јединице мере или у ml/g}\right], \text{односно, } K_{oc} = \frac{K_f}{f_{oc}}\left[\mu g/g\right] \qquad [3]$$

Однос између K_{oc} и K_d није увек линеаран, па вредности K_{oc} могу варирати од земљишта до земљишта, али је њихова варијабилност знатно мања у поређењу са варијабилношћу вредности K_d, односно K_f.K_{oc}се изводи дедукцијом из фактора капацитета (k’) употребом калибрационе криве у којој је log k’ исказан у односу на log K_{oc} изабраних референтних једињења.

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} \qquad [4]$$

при чему:

t_R јесте време (минути) задржавања или ретенционо време испитиване и референтне супстанце, које се бележи при HPLC;

t_0 јесте HPLC „мртво време”у минутима(видети одељак 1.8.2. ове методе).

K_{ow} јесте коефицијент расподеле у систему *n*-октанол/вода, однос између концентрација супстанце растворене у*n*-октанолу и оне растворене у води. Ова вредност исказује се као број без јединице мере.

$$P_{ow} = \frac{C_{октанол}}{C_{aq}} \left(= K_{ow}\right) \qquad (5)$$

1.3. РЕФЕРЕНТНЕ СУПСТАНЦЕ

Пре употребе ове методе неопходно је познавати структурну формулу, чистоћу и константу дисоцијације (ако је примерено) испитиване супстанце. Корисно је располагати и подацима о растворљивости, подеоном коефицијенту октанол-вода и својствима хидролизе испитиване супстанце.

Да би измерени подаци о ретенционом времену испитиване супстанце, добијени применом HPLC, корелирали са адсорпционим коефицијентом K_{oc}, израдити калибрациону криву у којој је log K_{oc} исказан у односу на log к'. Потребно је употребити најмање шест референтних тачака, од којих најмање једну изнад и једну испод очекиване вредности испитиване супстанце. Тачност методе значајно се повећава уколико се користи референтна супстанца која је по структури блиска испитиваној супстанци. Ако такви подаци нису доступни, избор примерених калибрационих супстанци представља одговорност лица које изводи испитивање. У том случају је потребно изабрати опште примењив сет супстанци. Супстанце и вредности K_{oc} које се овом приликом могу употребити користе се и у испитивању отпадног муља, а дате су у Табели 1. из Дела првог ове методе. Остале, које се користе у испитивању земљишта дате су у Табели 3. из Дела првогове методе. Избор других калибрационих супстанци образложити.

1.4. ПРИНЦИП МЕТОДЕ

HPLC се изводи на аналитичким колонама које се пакују заједно са тржишно доступном цијанопропилном чврстом фазом, која садржи липофилне и поларне групе. За ове намене користи се умерено поларна стационарна фаза чију основу чини силикагел:

– O – Si		– CH_2 – CH_2 – CH_2		– CN
силикагел		неполарни део		поларни део

Принцип методе сличан је начелу на ком се заснива и метода испитивања А.8. која је дата у овом правилнику (подеони коефицијент, HPLC метода испитивања). Док пролази кроз колону заједно са мобилном фазом, испитивана супстанца остварује интеракцију са стационарном фазом. Као резултат расподеле између мобилне и стационарне фазе, испитивана супстанца се задржава, тј. њен пролаз кроз колону се успорава. Двојаки састав стационарне фазе, тј. постојање поларних и неполарних група, омогућује интеракцију поларних и неполарних група молекула, сличну оној која се збива при интеракцији са органском материјом у околностима када матрикс чини земљиште, односно отпадни муљ. Ово омогућава успостављање односа између времена ретенције на колони и коефицијента адсорпције на органску материју.

Вредност pH има значајан утицај на адсорпционо понашање супстанци, нарочито поларних. Ако се ради о пољопривредним земљиштима, односно отпадном муљу са постројења за обраду комуналних отпадних вода, pH се најчешће креће између 5,5 и 7,5 јединица. Ако се ради о супстанцама подложним јонизацији, неопходно је испитати и њихов јонизовани и нејонизовани облик у адекватним пуферима, али само у случају када ће се при pH 5,5 до 7,5 дисосовати барем 10% испитиване супстанце.

Како се при вредновању користи искључиво однос између ретенције на HPLC колони и коефицијента адсорпције, није потребно применити било какву квантитативну аналитичку методу, али је потребно одредити ретенционо време. Уколико је на располагању прикладан сет референтних супстанци и ако се испитивање може извести у стандардним испитиваним условима, ова метода представља брз и ефикасан начин одређивања коефицијента адсорпције K_{oc}.

1.5. ПРИМЕНЉИВОСТ МЕТОДЕ

HPLC метода је примењива на хемијске супстанце (обележене и необележене) за које је доступан адекватан систем детекције (нпр. спектрофотометар, детектор радиоактивности) и које су у току трајања испитивања довољно стабилне. Метода може бити корисна за испитивање хемикалија које је тешко проучавати у другим испитиваним системима (нпр. испарљиве супстанце; супстанце које у води нису растворљиве у концентрацији која би била аналитички мерљива; супстанце које имају велики афинитет за површине инкубационих система). Метода се може употребити за испитивање смеша које при елуацији стварају нерастворне везе. У овом случају је неопходно навести горње и доње граничне вредности log K_{oc} једињења која чине испитивану смешу.

При тумачењу резултата добијених HPLC методом, проблеме могу причињавати различите нечистоће, али докле год се испитивана супстанца може јасно и недвосмислено аналитички одредити и од њих одвојити, ови проблеми нису од већег значаја.

Метода је вреднована за супстанце дате у Делу другом Табела 1 ове методе, а била је примењена и при испитивању низа других хемикалија, које спадају у следеће хемијске групе:

– ароматични амини (нпр. трифлуралин, 4-клороанилин, 3,5-динитроанилин, 4-метиланилин,*п*-метиланилин,1-нафтиламин);

– ароматичне естере карбоксилне киселине (нпр. метилестер бензоеве киселине, етилестер 3,5-динитробензоеве киселине);

– ароматичне угљоводике (нпр. толуен, ксилен, етилбензен, нитробензен);

– естре арилоксифеноксипропионске киселине (нпр. диклофоп-метил, феноксапроп-етил, феноксапроп-Р-етил);

– фунгициде из група бензимидазола и имидазола (нпр. карбендазим, фуберидазол, триазоксид);

– амиде карбоксилне киселине (нпр. 2-хлоробензамид, N,N-диметилбензамид, 3,5-динитробензамид,*п*-метилбензамид, 2-

нитробензамид, 3-нитробензамид);

– хлороване угљоводике (нпр. ендосулфан, DDT, хексаклоробензен, квинтозен, 1,2,3-триклоробензен);

– органофосфатне инсектициде (нпр. азинфос-метил, дисулфотон, фенамифос, изофенфос, пиразофос, сулпрофос, триазофос);

– феноле (нпр. фенол, 2-нитрофенол, 4-нитрофенол, пентаклорофенол, 2,4,6-триклорофенол, 1-нафтол);

– деривате фенилуреје (нпр. изопротурон, монолинурон, пенсикурон);

– пигментне боје (нпр. Acid Yellow 219, Basic Blue 41, Direct Red 81);

– полиароматичне угљоводике (нпр. аценафтен, нафтален);

– 1,3,5-триазинске хербициде (нпр. прометрн, пропазин, симазин, тербутрин);

– деривате триазола (нпр. тебуконазол, триадимефон, традименол, триапентенол).

Метода се не може применити за испитивање супстанци које реагују са ефлуентом или са стационарном фазом. Није примењива ни за испитивање супстанци које улазе у интеракцију са неорганским састојцима на специфичан начин (нпр. комплексирање са минералима из глине). Метода може бити неадекватна за површински активне супстанце, неорганска једињења и умерене или јаке органске киселине и базе. Њоме је могуће одредити log K_{oc} вредности које се крећу у опсегу од 1,5 до 5,0. Супстанце подложне јонизацији се мере помоћу пуферисане мобилне фазе, али се предузимају мере опреза како не би дошло до преципитације компоненти пуфера или испитиване супстанце.

1.6. КРИТЕРИЈУМИ КВАЛИТЕТА

1.6.1. Тачност

У нормалним условима коефицијент адсорпције испитиване супстанце може се одредити до унутар ± 0,5 log јединице вредности утврђене методом равнотежног стања (видети Део други Табела 1 ове методе). Тачност се може повећати употребом референтних супстанци структурно блиских испитиваној супстанци.

1.6.2. Поновљивост

Одређивања обављати најмање у дупликату. Вредности log K_{oc}изведене из појединачних мерења не смеју варирати за више од 0,25 log јединица.

1.6.3. Обновљивост

Искуства стечена применом ове методе, говоре у прилог њене ваљаности. Испитивање HPLC методе испитивања, којом је обухваћено 48 супстанци (већином пестицида) о чијем K_{oc} на земљиштима постоје поуздани подаци, резултирало је коефицијентом корелације од R = 0,95[10, 11].

Да би се ова метода унапредила и вредновала урађено је међулабораторијско поређење у којем је учествовало 11 лабораторија[12]. Резултати су дати у Делу другом Табела 2. ове методе.

1.7. ОПИС МЕТОДЕ

1.7.1. Прелиминарно утврђивање коефицијента адсорпције

Код нејонизованих супстанци као показатељи обима адсорпције могу послужити подеони коефицијент октанол-вода P_{ow} (= K_{ow}) и до одређене мере растворљивост у води. Ови параметри се могу користити и за прелиминарно проналажење опсега концентрација испитиване супстанце. За неколико група хемикалија објављено је низ корисних корелација[1, 2, 3, 4, 5, 6, 7].

1.7.2. Апаратура

Потребно је имати течни хроматограф на који је прикључена непулсирајућа пумпа и погодан уређај за детекцију. Препоручује се употреба вентила за убризгавање са инјекцијском петљом. Употребљавају се на тржишту доступне цијанопропилне колоне са подлогом од силикагела (нпр. Hypersil и Zorbax CN). Између система за убризгавање и аналитичке колоне може се поставити заштитна колона од истог материјала. Колоне различитих добављача могу знатно варирати у ефикасности раздвајања. Треба тежити да се достигну следећи фактори капацитета k’: log k’ > 0,0 за log K_{oc} = 3,0 и log k’ > -0,4 за log K_{oc} = 2,0 када се као мобилна фаза користи метанол/вода у односу од 55% према 45%.

1.7.3. Мобилне фазе

Испитано је неколико мобилних фаза и препоручују се:

1) метанол/вода (55/45% запреминских%);

2) метанол/0.01 M цитратни пуфер pH 6,0 (55/45% v/v).

За припремање растварача за елуацију користе се метанол HPLC чистоће и дестилована вода или цитратни пуфер. Пре употребе из смеше се одстрањује гас. Елуација је изократична. Ако није примерено употребити смеше метанола и воде, може се покушати са другим смешама органског растварача/воде, нпр. смешама етанола/воде или ацетонитрила/воде. За једињења

подложна јонизацији препоручује се употреба пуфера како би се стабилизовала pH вредност. Предузети мере опреза како би се избегла преципитација соли и пропадање колоне који се могу јавити при употреби неких смеша органске фазе и пуфера.

При извођењу ове методе не смеју се користити адитиви као што су реагенси на бази јонских парова, с обзиром на њихов могући утицај на сорпцијска својства стационарне фазе. Овакве промене стационарне фазе могу бити иреверзибилне, па се испитивања у којима се користе адитиви обавезно обављају на одвојеним колонама.

1.7.4. Растворљиве супстанце

Испитиване супстанце и референтне супстанце растворити у мобилној фази.

1.8. ИЗВОЂЕЊЕ МЕТОДЕ

1.8.1. Испитивани услови

Током мерења бележити температуру. Препоручује се коришћење уређаја у коме је температура одељка са колонама контролисана, како би се гарантовало да су услови под којима су обављени калибрација, утврђивање природе испитиване супстанце и њено мерење у току трајања целог испитивања били непромењени.

1.8.2. Одређивање „мртвог времена" t_0

За одређивање „мртвог времена" t_0 (када вршна вредност испитиване супстанце достигне и активира детектор) могу се користити две методе (видети одељак 1.2. ове методе).

1.8.2.1. Одређивање „мртвог времена" t_0 хомологним серијама

Доказано је да примена овог поступка резултира поузданим и стандардизованим t_0 вредностима (видети методу A.8: коефицијент расподеле у систему *n*-октанол/вода; HPLC метода испитивања која је дата у овом прилогу).

1.8.2.2. Одређивање „мртвог времена" t_0 инертним супстанцама које колона не задржава

Ова техника утемељена је на убризгавању раствора формамида, уреее или натријум нитрата. Мерења обавити најмање у дупликату.

1.8.3. Одређивање ретенционих времена t_R

Референтне супстанце изабрати на начин описан у одељку 1.3. ове методе. Могу се убризгати као стандардна смеша, како би се утврдило њихово ретенционо време, под условом да је потврђено да на ретенционо време ни једног од референтних стандарда не утиче присутност осталих. Калибрацију обављати у правилним временским размацима, најмање два пута дневно, како би се узеле у обзир неочекиване промене у ефикасности колоне. У циљу постизања најбољих резултата и превенције отклона у ретенционим временима, калибрација се врши пре и након убризгавања испитиване супстанце. Испитиване супстанце се убризгавају засебно у најмањим могућим количинама (како би се избегло преоптерећење колоне), а потом се одређују њихова ретенциона времена.

Да би мерења била поузданија, одређивања се обављају најмање у дупликату. Вредности log K_{oc} изведене из појединачних мерења не смеју варирати за више од 0,25 log јединица.

1.8.4. Процена

Фактори капацитета к' рачунају се из „мртвог времена" и ретенционих времена тR изабраних референтних супстанци, у складу са једначином 4 (видети одељак 1.2. ове методе). Подаци о logк' референтних супстанци се потом графички приказују у односу на вредности њихове log K_{oc}, добијене методом равнотежног стања наведене у Делу другом Табеле 1 и 3 ове методе. Потом се користећи криву за одређивање вредности log K_{oc} супстанце употреби вредност log k'. Уколико конкретни резултати покажу да се log K_{oc} испитиване супстанце налази изван калибрационог опсега, испитивање поновити користећи друге примеренije референтне супстанце.

2. ПОДАЦИ И ИЗВЕШТАЈ

Извештај о испитивању садржи:

– идентитет испитиване и референтних супстанци и њихове хемијске чистоће и уколико је од значаја вредности pK_a;

– опис опреме и услова испитивања, тј. врсте и величине аналитичке (и заштитне) колоне, начина детекције, мобилне фазе (однос састојака и pH), температурног опсега у току мерења;

– „мртво време" и метода којом је одређивано;

– количине испитиване и референтних супстанци убризганих у колону;

– ретенциона времена референтних састојака коришћених за калибрацију;

– детаљи о прилагођеној регресионој правој (logк' према log K_{oc}) и графички приказ регресионе праве;

– просечне податке о ретенцији и процењен d log K_{oc} вредности испитиваних једињења;

– хроматограме.

3. ЛИТЕРАТУРА

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 (Koc) for soils by HPLC. Chemosphere, 17, p. 167.

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, p. 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, p. 227-231.

5. Z. Gerstl, U. Mingelgrin (1984) Sorption of organic substances by soils and sediment. J. Environm. Sci. Health, B19, p. 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, p. 831-832.

7. S.W. Karickhoff, (1981) Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils. Chemosphere, 10, p. 833-846.

8. 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), p. 121-128.

9. M. Mueller, W. Kördel (1996) Comparison of screening methods for the estimation of adsorption coefficients on soil. Chemosphere, 32(12), p. 2493-2504.

10. W. Kördel, 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), p. 2341-2352.

11. B. von Oepen, W. Kördel, 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, p. 285-304.

12. 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), p. 1373-1384.

Део други

Табела 1: Поређење K_{oc} вредности за земљишта и канализациони муљ и вредности добијене HPLC методом[XXIV, XXV]

Референтна супстанца	CAS бр.	log K_{oc} отпадне воде	log K_{oc}	D	log K_{oc} земљишта	log K_{oc} HPLC	D
Атразин	1912-24-9	1,66	2,14	0,48	1,81	2,20	0,39
Линурон	330-55-2	2,43	2,96	0,53	2,59	2,89	0,30
Фентион	55-38-9	3,75	3,58	0,17	3,31	3,40	0,09
Монурон	150-68-5	1,46	2,21	0,75	1,99	2,26	0,27
Фенантрен	85-01-8	4,35	3,72	0,63	4,09	3,52	0,57
Фенилестер бензоеве киселине	93-99-2	3,26	3,03	0,23	2,87	2,94	0,07
Бензамид	55-21-0	1,60	1,00	0,60	1,26	1,25	0,01
4-Нитробензамид	619-80-7	1,52	1,49	0,03	1,93	1,66	0,27
Ацетанилид	103-84-4	1,52	1,53	0,01	1,26	1,69	0,08
Анилин	62-53-3	1,74	1,47	0,27	2,07	1,64	0,43
2,5-Диклоранилин	95-82-9	2,45	2,59	0,14	2,55	2.58	0,03

Табела 2: Резултати међулабораторијског поређења (11 лабораторија) обављеног у циљу побољшања и валидације HPLC-методе[XXVI]

Референтна супстанца	CAS-бр.	log K_{oc}	Koc	log Koc
		(OECD 106)	(HPLC -метода)	

Атразин	1912-24-9	1,81	78 ± 16	1,89
Монурон	150-68-5	1,99	100 ± 8	2,00
Триапентенол	77608-88-3	2,37	292 ± 58	2,47
Линурон	330-55-2	2,59	465 ± 62	2,67
Фентион	55-38-9	3,31	2062 ± 648	3,31

Табела 3: Препоручене референтне супстанце за HPLC методу на основу података о адсорпцији у земљишту

Референтна супстанца	CAS-бр.	log K_{oc} средње вредности методе равнотежног стања	Бр. података о K_{oc}	log S.D.	Извор
ацетанилид	103-84-4	1,25	4	0,48	XXVII
фенол	108-95-2	1,32	4	0,70	XXV
2-нитробензамид	610-15-1	1,45	3	0,90	XXVIII
N,N-диметилбензамид	611-74-5	1,52	2	0,45	XXV
4-метилбензамид	619-55-6	1,78	3	1,76	XXV
метилбензоат	93-58-3	1,80	4	1,08	XXV
атразин	1912-24-9	1,81	3	1,08	XXIX
изопротурон	34123-59-6	1,86	5	1,53	XXVII
3-нитробензамид	645-09-0	1,95	3	1,31	XXVI
анилин	62-53-3	2,07	4	1,73	XXV
3,5-динитробензамид	121-81-3	2,31	3	1,27	XXV
карбендазим	10605-21-7	2,35	3	1,37	XXVII
триадименол	55219-65-3	2,40	3	1,85	XXVII
триазоксид	72459-58-6	2,44	3	1,66	XXVII
триазофос	24017-47-8	2,55	3	1,78	XXVII
линурон	330-55-2	2,59	3	1,97	XXVII
нафтален	91-20-3	2,75	4	2,20	XXV
ендосулфан-диол	2157-19-9	3,02	5	2,29	XXVII
метиокарб	2032-65-7	3,10	4	2,39	XXVII
Acid Yellow 219	63405-85-6	3,16	4	2,83	XXV
1,2,3-трихлоробензен	87-61-6	3,16	4	1,40	XXV
g-HCH	58-89-9	3,23	5	2,94	XXV
фентион	55-38-9	3,31	3	2,49	XXVII
Direct Red 81	2610-11-9	3,43	4	2,68	XXV
пиразофос	13457-18-6	3,65	3	2,70	XXVII
a-ендосулфан	959-98-8	4,09	5	3,74	XXVII
диклофоп-метил	51338-27-3	4,20	3	3,77	XXVII

фенантрен	85-01-8	4,09	4	3,83	XXV
Basic Blue 41(смеша)	26850-47-5 12270-13-2	4,89	4	4,46	XXV
DDT	50-29-3	5,63	1	–	XXVI

_____

XXVI 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.

XXIV W. Kördel, D. Hennecke, M. Herrmann (1997). Application of the HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on sewage sludges. Chemosp here, 35(1/2), 121-128.

XXV W. Kördel, D. Hennecke, C. Franke (1997). Determination of the adsorption-coefficients of organic substances on sewage sludges. Chemosphere, 35 (1/2), 107-119.

XXVII W. Kördel, J. Müller (1994). Bestimmung des Adsorptionskoeffizienten organischer Chemikalien mit der HPLC.UBA R & D Report No.106 01 044 (1994).

XXVIII B.V. Oepen, W. Kördel, W. Klein., (1991) Chemosphere, 22, p. 285-304.

XXIX Податке доставља индустрија.

C.20. МЕТОДА ИСПИТИВАЊА ТОКСИЧНОСТИ ПО РЕПРОДУКЦИЈУ ВРСТЕ *Daphnia magna*

Део први

1. МЕТОДА ИСПИТИВАЊА

Метода се заснива на Упутству за испитивање OECD 211 (1998).

1.1. УВОД

Основни циљ методе испитивања је процена утицаја хемикалија на репродукцију *Daphnia magna*.

1.2. ДЕФИНИЦИЈЕ И МЕРНЕ ЈЕДИНИЦЕ

Испитиване јединке јесу женке дафније које су на почетку испитивања у стадијуму неонате и код којих се испитује способност стварања потомства.

Потомство јесу младе дафније настале партеногенезом испитиваних јединки у току трајања испитивања.

Најнижа ефективна концентрација (Lowest Observed Effect Contrencation, у даљем тексту: LOEC) јесте најнижа концентрација испитиване супстанце која доводи до статистички значајних промена на нивоу размножавања и преживљавања испитиваног организама (при $p < 0,05$) у поређењу са контролом унутар наведеног периода изложености. Све испитиване концентрације изнад LOEC имају штетан утицај, једнак или већи од оних примећених код LOEC. Када се не могу задовољити ова два услова, даје се детаљно објашњење на који је начин изабрана LOEC (а тиме и NOEC).

Концентрација без уоченог ефекта (No Observed Effect Contrencation, у даљем тексту: NOEC) јесте највиша испитивана концентрација, а прва испод LOEC, која у поређењу са контролом не доводи до статистички значајне промене ($p < 0,05$) посматраног параметра унутар наведеног периода изложености.

EC_x је концентрација испитиване супстанце растворене у води која резултира са x посто смањења репродукције *Daphnia magna* унутар назначеног периода изложености.

Стварна брзина раста је мера раста популације која обједињује способност размножавања и смртност специфичну за одређену старост. Ако је популација у равнотежном стању стварна брзина раста биће нула. За растуће популације стварна брзина раста биће позитивна, а за популацију која се смањује биће негативна и довешће до њеног изумирања.

Граница детекције јесте најнижа концентрација која се може детектовати, али не и квантификовати.

Граница одређивања јесте најнижа концентрација која се може квантитативно одредити.

Морталитет животиња јесте случај када се јединка сматра угинуломјер је непокретна, тј. када не може да заплива, или када нема видљивих покрета екстремитета или постабдоменани 15 секунди након пажљивог протресања посуде за испитивање.[XXX]

_____

XXX Употреба других дефиниција се образлаже уз наводе одговарајуће литературе.

1.3. ПРИНЦИП МЕТОДЕ

Младе женке дафнија (испитиване јединке – неонате) старе мање од 24 сата на почетку испитивања, излажу се испитиваној супстанци која се додаје у воду у одређеном опсегу концентрација. Дужина испитивања је 21 дан. На крају испитивања одређује се укупан број преживелог потомства које је добијено партеногенезом јединки које су преживеле испитивање. Не броји се потомство испитиваних јединки које су у угинуле у току студије. То значи да се не броји потомство испитиваних јединки које су, у међувремену, угинуле. Способност размножавања испитиваних јединки се може изразити и на друге начине (нпр. као живо потомство по испитиваној јединки на одређени дан, од првог дана кад се уоче први потомци), али би се о њима требало известити заједно са укупним бројем потомства по живој испитиваној јединки на крају испитивања. Способност размножавања животиња изложених испитиваној супстанци пореди се са контролама да би се одредили LOEC и NOEC. Подаци се анализирају помоћу регресионог модела како би се одредила концентрација која доводи до смањења способности репродукције за x% (тј. EC_{50}, EC_{20} или EC_{10}).

Наводе се и подаци о преживљавању испитиваних јединки и о времену потребном за стварање прве генерације потомака. Могу се утврдити и остала дејства испитиване супстанце на параметре као што су раст (дужина) и ако је могуће стварна брзина раста.

1.4. ПОДАЦИ О ИСПИТИВАНОЈ СУПСТАНЦИ

Треба имати резултате испитивања акутне токсичности (видети Део други методе C.2. која је дата у овом прилогу) изведеног са врстом *Daphnia magna*. Резултат може бити користан при избору одговарајућег опсега испитиваних концентрација код испитивања токсичности по репродукцију. Растворљивост у води и напон пара испитиване супстанце потребно је да буду познати и да буде доступна поуздана аналитичка метода за квантификацију супстанце у растворима са назначеним вредностима ефикасности аналитичке методе и границе одређивања.

Међу податке о испитиваној супстанци који би могли бити корисни у одређивању испитиваних услова убрајају се структурна формула, чистоћа супстанце, стабилност на светлу, стабилност у условима испитивања, pK_a, P_{ow} и резултати испитивања биоразградивости (видети методу C.4. која је дата у овом прилогу).

1.5. ПРИХВАТЉИВОСТ МЕТОДЕ

Да би испитивање било прихватљиво, испуњавају се критеријуми квалитета у контролама:

– смртност испитиваних јединки (женке дафнија) не прелази 20% на крају испитивања;

– просечан број живих потомака по испитиваној јединки на крају испитивања је ≥ 60.

1.6. ОПИС МЕТОДЕ

1.6.1. Апаратура

Посуде за испитивање и остала апаратура која долази у контакт са испитиваним растворима су искључиво од стакла или другог хемијски инертног материјала. Посуде за испитивање су најчешће стаклене чаше.

Додатно су потребни:

– оксиметар (с микроелектродама или другом прикладном опремом за мерење раствореног кисеоника у узорцима мале запремине);

– адекватна опрема за контролу температуре;

– pH метар;

– опрема за одређивање тврдоће воде;

– опрема за одређивање TOC у води или опрема за одређивање ХПК;

– адекватна апаратура за контролу светлосног режима и мерење јачине светлости.

1.6.2. Испитивани организми

Врста које се користи у методи испитивања је *Daphnia magna* Straus. Друге врсте рода *Daphnia* се могу користити ако задовољавају критеријуме прихватљивости (за коришћење врста рода *Daphnia* меродаван критеријум прихватљивости је способност размножавања у контролним условима који вреди за врсте рода *Daphnia*). Ако се користе друге врсте рода *Daphnia*то јасно се дефинише и оправдава њихова употреба.

Најбоље је да се клон одреди генотипизацијом. Истраживања[1] су показала да репродуктивни потенцијал Клона А[3] конзистентно одговара критеријуму прихватљивости средње вредности од ³ 60 неоната по преживелој јединки, узгајаној у условима описаним у овој методи. Прихватљиви су и други клонови, под условом да култура дафнија задовољава критеријуме прихватљивости.

На почетку испитивања, животиње морају бити старе мање од 24 сата (тзв. неонате) и не би смеле бити прва генерација потомства. Оне треба да потичу из здраве матичне линије (односно без знакова стреса као што су висока смртност, присуство мужјака и зимских јаја (ephippia), кашњење у појави прве генерације потомства, депигментисане животиње, итд.). Матична линија животиња се одржава у константним лабораторијским условима (светло, температура, медијум, исхрана и број јединки по јединици запремине) који су слични онима у испитивању. Ако се медијум са културом дафнија који се користи у испитивању разликује од рутинске културе дафнија, пожељно је омогућити период аклиматизације пре испитивања од обично 3 недеље (колико је потребно да се добије једна генерација животиња) да би се избегао стрес за

испитиваних јединки.

1.6.3. Медијум

Препоручује се употреба потпуно дефинисаног медијума. Тиме се избегава употреба адитива (нпр. морска трава, екстракт земљишта, итд.) које је тешко окарактерисати и унапређује се међулабораторијска стандардизација. Еландт медијуми M4 и M7 (видети Део други ове методе) сматрају се прикладнима у ове сврхе. Прихватљиви су и други медијијуми[5,6] под условом да се покаже да култура дафнија задовољава критеријуме прихватљивости испитивања.

Ако се користе медијуми са недефинисаним адитивима, те адитиве навести и у извештају о испитивању изнети податке о саставу медијума, нарочито с обзиром на садржај угљеника, јер то може утицати на храну којом се животиње хране. Препоручује се да се одреди ТОС, односно ХПК у медијуму матичне линије и да се процени њихов удео у ТОС/ХПК медијума у којем ће се извести. Препоручује се да садржај ТОС у медијуму (пре додавања алги) буде мањи од 3 mg/l[2].

При испитивању супстанци које садрже метале, важно је имати на уму да састав медијума (нпр. тврдоћа, наградња хелата) може утицати на процену токсичности испитиване супстанце. Пожељно је да медијум буде потпуно дефинисан. За сада се од сасвим дефинисаних медијума прикладних за одржавање врсте *Daphnia magna* у дуготрајној култури, зна само за Еландт медијуме M4 и M7. Оба медијума садрже хелатизирајуће једињење EDTA. Показало[2] се да је „привидна токсичност" кадмијума генерално нижа када се у испитивању токсичности по репродукцију користе медијуми M4 или M7 уместо медијума који не садрже EDTA. Стога се коришћење M4 ни M7 не препоручује за испитивање супстанци које садрже метале, а избегавати и остале медијуме за које се зна да садрже хелатизирајућа једињења. За испитивање супстанци које садрже метале било би препоручљиво користити алтернативне медијуме, попут, нпр. тврде воде реконституисане према ASTM[7], која не садржи EDTA и којој се додаје екстракт морских алги[8]. Та комбинација тврде воде припремљене према ASTM и екстракта морских алги прикладна је и за одржавање врсте *Daphnia magna*[2] у дуготрајној култури, премда још увек има слабу хелатизирајућу активност због органских састојака додатог екстракта морских алги.

На почетку и у току испитивања концентрација раствореног кисеоника је изнад 3 mg/l. Вредност pH је потребно да буде у опсегу од 6 до 9 и у нормалним околностима не сме да колеба за више од 1,5 јединице ни у једном тесту. Препоручује се тврдоћа већа од 140 mg/l (као $CaCO_3$). Тестови изведени при тој или већим концентрацијама показали су да је способност размножавања у складу са критеријумима прихватљивости[9, 10].

1.6.4. Тест раствори

Тест раствори изабраних концентрација припремају се разблаживањем основног раствора. Основне растворе припремати растварањем супстанце у тест медију.

У неким случајевима може се указати потреба за коришћењем органских растварача или дисперзионих средстава, како би се припремио основни раствор жељене концентрације. Употребу наведених материјала, уколико је могуће, избегавати. Прикладни растварачи су: ацетон, етанол, метанол, диметилформамид и триетиленгликол. Прикладна дисперзиона средства су: Cremophor RH40, 0,01% метилцелулоза и HCO-40. Концентрација испитиване супстанце у раствору не сме да буде већа од граничне растворљивости те супстанце у медијуму.

Растварачи се користе за припрему основног раствора који ће моћи прецизно да се дозира. При препорученим концентрацијама растварача у коначном медијуму (≤ 0,1 ml/l) наведени растварачи не делују токсично и не повећавају растворљивост испитиване супстанце у води.

Дисперзиона средства могу омогућити прецизно дозирање и дисперзију. При препорученим концентрацијама у коначном, медијуму (≤ 0,1 ml/l) наведена дисперзиона средства не делују токсично и не повећавају растворљивост испитиване супстанце у води.

1.7. ПОСТАВКА ИСПИТИВАЊА

Третмани (концентрације) распоређују се по посудама за испитивање по случајном распореду. У супротном, могуће је добити необјективе резултате који се погрешно могу приписати разликама у концентрацији испитиване супстанце. Ако се екпериментални поступци изводе у сталном редоследу од ниже према вишој концентрацији, могућа је појава одређених временски–зависних ефеката попут замора лица које врши испитивање или неке друге грешке, што може довести до привидног појачања ефекта испитиване супстанце у третманима са вишим концентрацијама. Ако постоји могућност да резултати испитивања зависе од почетних услова или услова околине, нпр. од места у лабораторији, размотрити могућност испитивања у блок–систему.

1.8. ПОСТУПАК

1.8.1. Услови при излагању

1.8.1.1. Дужина испитивања

Испитивање траје 21 дан.

1.8.1.2. Густина насада испитиваних јединки

Испитиване јединке држе се одвојено, по једна у свакој испитиваној посуди, у 50 ml до 100 ml медијума у свакој посуди. Понекад су потребне веће запремине, да би се задовољили захтеви аналитичког поступка који се користи за одређивање концентрације испитиване супстанце, а допуштено је и обједињавање узорака из више посуда за испитивање истог третмана потребних за хемијску анализу. Ако се користе запремине веће од 100 ml, дозвољено је повећати количину хране која се даје дафнијама да би се обезбедила адекватна доступност хране и да би се задовољили критеријуми квалитета. Код

испитивања у проточним условима, поставка може, због техничких разлога, бити и другачија (нпр. четири групе по 10 јединки, у испитиваним посудама у већој запремини), али све измене у поставци навести у извештају.

1.8.1.3. Број јединки

За испитивања у полустатичном систему, потребно је најмање 10 јединки по третману (концентрацији) постављених појединачно у испитиваној посуди и исто толико у контролном третману.

Код испитивања у проточним условима показала се задовољавајућом поставка са 40 јединки подељених у четири групе по 10 јединки за сваки третман (концентрацију испитиване супстанце)[1]. Може се радити и са мањим бројем животиња, али се препоручује најмање 20 животиња по концентрацији, подељених у две или више паралелних група (реплика, копија) са једнаким бројем животиња у свакој групи (нпр. по четири реплике са по пет дафнија у свакој). При поставци са више од једне дафније по посуди за испитивање, није могуће репродукцију изразити као укупни број живих потомака по испитиваној јединки преживелој до краја испитивања, ако јединка угине пре краја испитивања. У таквим случајевима репродукцију изразити као укупни број живих потомака добијен од испитиваних јединки присутних са почетка испитивања.

1.8.1.4. Исхрана

При поставци у полустатичном систему, јединке је пожељно хранити сваки дан, а најмање три пута недељно (тј. при промени медијума). Ако се одступи од оваквог режима исхране (нпр. код поставке у проточним условима), то навести у извештају о испитивању.

Током трајања испитивања, испитиване јединке хранити живим алгама једне или више врста: врсте рода *Chlorella*, *Selenastrum capricornutum* (сада *Pseudokirchneriella subcapitata*[11]) і *Scenedesmus subspicatus*. Количину хране одредити према количини органског угљеника (C) потребног свакој испитиваној јединки. Истраживања[12] су показала да је за одржавање врсте *Daphnia magna* довољна концентрација од 0,1 до 0,2 g/C/јединки/дан, да би се добио број потомака потребан у складу са критеријума за прихватљивост резултата испитивања. Храну давати или у сталној количини у току трајања испитивања или по жељи, на почетку давати мање количине, а потом у току испитивања како испитиване јединке расту количину постепено повећавати. Количина хране се креће у препорученом опсегу од 0,1 до 0,2 g/C/индивидуе/дан.

Ако се за израчунавање количине потребне хране користе алтернативни показатељи, као што је број алгалних ћелија или абсорбанца (ради лакше процене, јер је мерење садржаја угљеника захтевна дуготрајна метода), свака лабораторија прави сопствени номограм процене садржаја угљеника у алгама на основу алтернативних показатеља (за препоруке о изради номограма видети Део трећи ове методе). Номограми се проверавају најмање једном годишње или чешће, ако су се променили услови у културама алги. Апсорбанција се показала бољим алтернативним показатељем садржаја угљеника него број ћелија[13].

Дафније хранити концентрованом суспензијом алги, како би количина медијума за алгалне културе која ће се додати медијуму свела на минимум. Суспензија алги се може направити центрифугирањем и поновним ресуспендирањем у дестилованој води, дејонизованој води или у медију за гајење дафнија.

1.8.1.5. Светлосни режим

16 сати светла јачине која не прелази 15–20 mE/m^2c^{-1}.

1.8.1.6. Температура

Температура медијума у којем се изводи испитивање је у опсегу од 18° C до 22° C. Без обзира на врсту испитивања, температура унутар опсега не варира за више од 2° C (нпр. да је 18° C до 20° C, 19° C до 21° C или 20° C до 22° C). Може се показати прикладним припремити додатну посуду за испитивање са медијумом за праћење температуре.

1.8.1.7. Аерација

Посуде за испитивање се не аеришу у току испитивања.

1.8.2. Концентрација испитиване супстанце

Уобичајено је да се испитивање изводи у најмање 5 концентрација испитиване супстанце у геометријској серији концентрација, распоређеним са фактором не већим од 3,2 и у потребном броју понављања (реплика) по третману (видети одељак 1.8.1.3. ове методе). Ако се испитивање изводи са мање од пет концентрација, образложити разлоге. Супстанце не испитивати у концентрацијама вишим од њихове растворљивости у медијуму.

При одређивању опсега концентрација водити рачуна о:

– ако је циљ добијање вредности LOEC/NOEC, најнижа испитивана концентрација је довољно ниска, тако да фекундидет при тој концентрацији не буде статистички значајно нижи од оне у контролама. У случају другачијег одговора, испитивање поновити са сниженом најнижом испитиваном концентрацијом;

– ако је циљ добијање вредности LOEC/NOEC, највиша испитивана концентрација је довољно висока, тако да фекундитет при тој концентрацији буде статистички значајно нижи него у контролним условима. У случају другачијег одговора, испитивање поновити са вишом највишом испитиваном концентрацијом;

– ако се одређује EC_x, ефективна концентрација која утиче на способност размножавања, препоручљиво је применити довољан опсег концентрација, како би се EC_x одредила са задовољавајућим интервалима поверења. Ако се одређује EC_{50}, ефективна концентрација за способност размножавања, препоручљиво је да највиша примењена концентрација буде већа од

EC_{50}. У супротном ће, иако ће EC_{50} моћи да се одреди, интервал поверења за EC_{50} бити веома широк и можда неће бити могуће на задовољавајући начин оценити адекватност изабраног модела;

– настојати да се у серију испитиваних концентрација не укључи ниједна која има статистички значајно дејство на преживљавање одраслих животиња, јер би се тиме променила природа испитивања; то више не би било само испитивање токсичности по репродукцију, већ комбиновано испитивање токсичности по репродукцију и смртност, па би и статистичка анализа добијених резултата била много сложенија.

Претходно познавање токсичности испитиване супстанце (нпр. резултати испитивања акутне токсичности, односно резултати прелиминарног испитивања постављеног у циљу одређивања опсега испитиваних концентрација) могу помоћи при избору адекватне серије адекватног опсега испитиваних концентрација.

У случајевима када се за припрему испитиваних раствора користи растварач или дисперзионо средство (видети одељак 1.6.4. ове методе), његова финална концентрација у испитиваним посудама не сме бити већа од 0,1 ml/l и је једнака у свим посудама.

1.8.3. Контроле

При сваком испитивању поставити једну контролу са медијумом и уколико је потребно, једну серију контрола са растварачем или дисперзионим средством. Када се користи растварач или дисперзионо средство, његова концентрација у контролном медијуму је једнака оној у испитиваним посудама са испитиваном супстанцом. Припремити потребан број реплика (паралелних узорака, копија) (видети одељак 1.8.1.3. ове методе).

При добро изведеном испитивању, коефицијент варијације броја живих потомака добијених од испитиваних јединки у контролним групама износи £ 25%, и то навести у извештају о испитивању када се испитивање изводи са по једном јединком у свакој испитиваној посуди.

1.8.4. Промена испитиваног медијума

Динамика промене испитиваног медијума зависи од стабилности супстанце која се испитује, али медијум мењати најмање три пута недељно. Ако прелиминарно испитивање стабилности (видети одељак 1.4. ове методе) покаже да концентрација испитиване супстанце није стабилна, т.ј. да је изван номиналног опсега од 80% до 120% или да износи мање од 80% почетне концентрације у току најдужег периода у коме се мења медијум – три дана, размотрити могућност чешће промене медијума, или испитивање у проточним условима.

Када се медијум мења у току испитивања у семистатичким условима, припремити још једну серију посуда за испитивање и у њих пребацити испитиване јединке, нпр. помоћу стаклених пипета адекватног промера. Треба пазити да се притом у нову посуду са дафнијом пребаци што мање медијума.

1.8.5. Посматрање

Резултате посматрања бележити у одговарајуће обрасце (за примере видети Део четврти и пети ове методе). Ако су потребна и друга мерења (видети одељак 1.3. и 1.8.8. ове методе), може се показати потребним и додатно проматрање.

1.8.6. Потомство

Потомство сваке испитиване јединке, ако је могуће, свакодневно одвајати и бројати, од појаве прве генерације потомака, како би се избегло да потомство троши храну намењену родитељским јединкама. За потребе ове методе броје се само живи потомци, но може се бележити и присуство абортираних јаја и угинулих потомака.

1.8.7. Морталитет

Смртност међу испитиваним јединкама прати се свакодневно или најмање онолико често колико се броје и добијени потомци.

1.8.8. Остали параметри

Иако је ова метода намењена првенствено процени дејства супстанци на репродукциони потенцијал, њоме се могу одређивати квантитативно и други ефекти, у довољној мери да то омогући статистичку анализу. Пожељно је пратити раст, јер се тиме добија податак о могућим сублеталним ефектима који може бити кориснији од самог мерења способности репродукције. Препоручује се и мерење дужине испитиваних јединки (т.ј. дужине тела без аналног наставка) на крају испитивања. Међу остале показатеље који се могу мерити или израчунати убрајају се време потребно за појаву прве генерације потомака (и идућих генерација), број и величина легла по животињи, број одбачених легла, присутност мужјака или ефипија, као и стварна стопа раста популације.

1.8.9. Учесталост аналитичких одређивања и мерења

Концентрацију кисеоника, температуру, тврдоћу и pH вредност мерити најмање једном недељно, у свежем и старом медијуму и то у контролама и у медијуму са највишом концентрацијом испитиване супстанце.

Током испитивања се у правилним временским интервалима мери и концентрација испитиване супстанце.

При испитивању у полустатичном систему, код којих се очекује да концентрације испитиване супстанце не варирају за више од ± 20% од номиналних вредности (т.ј. да се крећу у опсегу 80% до 120% – видети одељак 1.4 и 1.8.4. ове методе), препоручује се да се анализирају барем највиша и најнижа испитивана концентрација и то при припреми свежег медијума и једном недељно у току испитивања, промени медијума (т.ј. анализу обавити у узорку исте концентрације, при припреми те

концентрације и при промени медијума). Та одређивања понављати у интервалима од најмање једном недељно.

При испитивањима код којих се очекује да концентрације испитиване супстанце варирају за више ± 20% од номиналних вредности, неопходно је анализирати све испитиване концентрације, при њиховој припреми и при промени медијума. Код испитивања код којих мерење почетне концентрације испитиване супстанце покаже да она није унутар опсега од ± 20% номиналне вредности, али има довољно доказа да се те почетне концентрације могу понављати и да су стабилне (тј. да се крећу у опсегу 80% до 120% од почетних), хемијска одређивања у 2. и 3. недељи испитивања могу да се ограниче на проверу најниже и највише концентрације. У сваком случају, концентрацију испитиване супстанце пре промене медијума проверити само у једној од реплика (паралелних узорака) за сваку од концентрација.

Ако се испитивање спроводи у проточном систему, примерен је сличан режим узимања узорка као и у полустатичном систему (осим што се у том случају не може мерити концентрација супстанце у ранијим узорцима). Од користи је да се повећа број узорака узетих у току прве недеље испитивања, односно да се обављају три комплета мерења како би се осигурало да концентрације остану стабилне. При испитивањима у проточном систему свакодневно проверавати брзину протока медијума и испитиване супстанце.

Ако се докаже да се концентрација испитиване супстанце у току испитивања одржава унутар задовољавајућег опсега од ± 20% од номиналне вредности или вредности измерене на почетку испитивања, резултати се могу заснивати на номиналној или на измереној почетној вредности. Ако одступања од номиналне или почетне измерене вредности прелазе ± 20%, резултате изразити у терминима средње вредности у функцији времена (видети Део шести ове методе).

2. ПОДАЦИ И ИЗВЕШТАЈ

2.1. ОБРАДА РЕЗУЛТАТА

Циљ ове методе испитивања је одређивање утицаја испитиване супстанце на укупни број живих потомака добијених по живој испитиваној јединки на крају испитивања. Укупни број живих потомака по испитиваној јединки израчунати за сваку посуду за испитивање (тј. за сваку реплику или паралелни узорак). Узорак у којем је испитивана јединка у току испитивања угинула или се покаже да је испитивана јединка била мужјак, искључити из анализе. У том случају ће се анализа заснивати на смањеном броју реплика.

Када се, у склопу процене утицаја хемикалије на способност репродукције одређује LOEC, а тиме и NOEC, потребно је израчунати средњу вредност репродукције за све реплике при одређеној концентрацији, као и резидуалну стандардну девијацију, што се може учинити анализом варијансе (у даљем тексту: ANOVA). Средња вредност добијена за сваку концентрацију пореди се са средњом вредношћу контролног третмана, служећи се адекватном, статистичком методом за вишеструка поређења. Испитивања која у ову сврху могу бити од користи дата су у литератури[14, 15, 16, 17]. Неопходно је проверити да ли вреди ANOVA претпоставка о хомогености варијансе. Препоручује се да се то учини графички, а не формалним израчунавањем статистичке значајности[18]. Алтернативно, може послужити и Бартлетов тест. Ако претпоставка не вреди, тада пре извођења ANOVA размотрити могућност трансформације података ради хомогенизовања варијансе или уместо ANOVA извести пондирану ANOVA. Израчунати и навести и осетљивост ANOVA (најмању статистички значајну разлику).

За одређивање EC_{50} из добијених резултата израчунати одговарајућу криву, нпр. логистичку криву, служећи се адекватном статистичком методом, нпр. методом најмањих квадрата. Крива се може параметризовати, тако да се EC_{50} и њена стандардна грешка могу директно одредити. Тиме се знатно олакшава израчунавање интервала поверења за EC_{50}. Навести двострани 95%-тни интервал поверења, осим ако не постоје добри разлози да се предност да неком другом нивоу поузданости. Поступак уклапања криве обезбеђује и начин за оцену статистичког значаја изостанка подударности са кривом. То се може учинити графички или дељењем остатка суме квадрата у категорију „недостатак подударности” (lack of fit) и у категорију „компоненте чисте грешке” (pure error components) и тестом статистичког значаја за недостатак подударности. Будући да у третманима са високим фекундитетом постоји тенденција веће варијансе у броју потомства него у третманима са ниским фекундитетом, па је потребно размотрити и могућност пондирања добијених вредности, како би се уважила различитост варијанси између третмана (видети у литератури[18]).

При анализи података добијених у међулабораторијској провери[2], логистичка крива је израчуната помоћу следећег модела, иако се користе и други адекватни модели:

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

при чему:

Y јесте укупни број потомака по живој родитељској животињи на крају испитивања (израчунато за сваку испитивану посуду);

x јесте концентрација испитиване супстанце;

c јесте очекивани број потомака када је $x = 0$;

x_0 јесте EC_{50} у популацији;

b јесте нагиб криве.

Овај модел је највероватније прикладан за већи број ситуација, али има и ситуација за које неће одговарати. Зато проверити ваљаност модела, као што је горе наведено. У неким случајевима могао би да одговара хормезис модел у ком

ниске концентрације имају појачано дејство.

Могу се проценити и друге ефективне концентрације, нпр. EC_{10} или EC_{20}, иако у том случају предност а дати другачијој параметризацији модела од оне која се користила за процену EC_{50}.

2.2. ИЗВЕШТАЈ

Извештај о испитивању садржи податке о:

1) испитиваној супстанци:

– природа супстанце и меродавна физичко-хемијска својства,

– подаци о идентификацији хемикалије, укључујући чистоћу;

2) испитиваној врсти:

– клон (генотипизиран или не), добављач или извор (ако је познат) и услови гајења културе. Ако се не користи врстан *Daphnia magna*, наводи се образложење;

3) условима испитивања:

– коришћени поступак (нпр. семистатични или проточни систем, запремина, број дафнија по литри),

– фотопериод и јачина светла,

– поставка испитивања (нпр. број реплика, број родитељских јединки по реплици),

– детаљи о коришћеном медију за гајење културе,

– подаци о органском материјалу, ако је коришћен, укључујући податке о саставу, извору, методи припреме, ТОС/ХПК основног раствора, вредности ТОС/ХПК измерене у медијуму,

– детаљне податке о исхрани, укључујући количину хране у mg/C/Дафнија/дан) и режим (нпр. врста хране – ако је реч о алгама, навести тачно име врсте и ако је познато, навести сој и услове гајења у култури),

– методе припреме основних раствора и динамику измене (навести растварач или дисперзионо средство, ако је коришћено);

4) резултатима:

– резултати било каквих прелиминарних студија о стабилности испитиване супстанце,

– номинална концентрација и резултати свих мерења концентрације испитиване супстанце у испитиваним посудама (видети пример обрасца у Делу петом ове методе), подаци о ефикасности аналитичке методе и границама детекције,

– квалитет воде у испитиваним посудама, тј. подаци о pH, температури и концентрацији раствореног кисеоника, подаци о ТОС, односно ХПК и тврдоћи (видети пример обрасца у Делу четвртом ове методе);

– потпуни подаци о потомству добијеном од сваке родитељске јединке (видети пример обрасца у Делу четвртом ове методе);

– број угинулих родитељских јединки и дан када су угинуле (видети пример обрасца у Делу четвртом ове методе);

– коефицијент варијације фекундитета у контролним групама (заснива сена укупном броју живих потомака по живој родитељској јединки на крају испитивања);

– графички приказ зависности укупног броја живих потомака по живој родитељској јединки (за сваку реплику) на крају испитивања насупрот концентрацији испитиване супстанце;

– LOEC по репродукцију, укључујући опис примењених статистичких поступака и назнака о најнижој статистички значајној разлици која се може детектовати, као и ако је применљиво, податак о највишој испитиваној концентрацији која не доводи до NOEC. Навести и податак о LOEC/NOEC за смртност родитељских јединки;

– где је прикладно, навести EC_x за репродукцију, интервале поверења и графички приказ модела употребљеног за њихово израчунавање, нагиб криве дозне зависности и његову стандардну грешку;

– остали уочени биолошки ефекти и мерења – навести податке о свим осталим биолошким ефектима који су уочени или измерени (нпр. раст родитељских јединки), укључујући одговарајуће образложење;

– образложење за свако одступање од методе испитивања.

3. ЛИТЕРАТУРА

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 №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, p. 257-265.

4. Elendt B.P., (1990) Selenium deficiency in Crustacea; An ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. Protoplasma, 154, p. 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, p. 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. p. 20.

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.) p. 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, p. 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), p. 185-196.

11. Korshikov (1990) *Pseudokirchneriella subcapitata* Hindak, F-1990. Biologice Prace, 36, p. 209.

12. Sims I.R., Watson S. and Holmes D., (1993) Toward a standard *Daphnia juvenile* production test. Environmental Toxicology and Chemistry, 12, p. 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, p. 1096-1121.

15. Dunnett C.W., (1964) New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20, p. 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, p. 103-117.

17. Williams D.A., (1972) The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics, 28, p. 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, p. 93-96.

20. Wilson E.O. and Bossert, W.H., (1971) A Primer of Population Biology. Sinauer Associates Inc. Publishers.

Део други
ПРИПРЕМА ПОТПУНО ДЕФИНИСАНИХ МЕДИЈУМА Еландт М7 И М4

Аклиматизација на медијуме Еландт М7 и М4

Неке лабораторије су имале потешкоћа при директном премештању дафнија у медијуме М4[1] и М7. Одређен успех је постигнут поступном аклиматизацијом, односно премештањем животиња из природног медијума у 30%, потом 60% и на крају 100% Еландт. Аклиматизациони период може потрајати и месец дана.

ПРИПРЕМА

Елементи у траговима

Прво се припремају одвојени основни раствори (I) сваког појединог елемената у траговима у води одговарајуће чистоће, нпр. дејонизованој, дестилованој или водом добијеном реверзном осмозом. Из тих различитих основних раствора (II) припрема се један раствор (II) који садржи све елементе у траговима (комбиновани раствор), нпр:

Основни раствори I (појединачне супстанце)	Количина која се додаје у воду (mg/l)	Концентрација (у поређењу са медијумом М4) пута	За припремање комбинованог раствора II – додати следећу количину основног раствора I у воду (ml/l)	
			М 4	М 7
H_3BO_3	57.190	20.000	1,0	0,25

$MnCl_2$Í $4H_2O$	7.210	20.000	1,0	0,25
LiCl	6.120	20.000	1,0	0,25
RbCl	1.420	20.000	1,0	0,25
$SrCl_2$Í $6H_2O$	3.040	20.000	1,0	0,25
NaBr	320	20.000	1,0	0,25
Na_2MoO_4Í$2H_2O$	1.260	20.000	1,0	0,25
$CuCl_2$Í$2H_2O$	335	20.000	1,0	0,25
$ZnCl_2$	260	20.000	1,0	1,0
$CoCl_2$Í $6H_2O$	200	20.000	1,0	1,0
KI	65	20.000	1,0	1,0
Na_2SeO_3	43,8	20.000	1,0	1,0
NH_4VO_3	11,5	20.000	1,0	1,0
Na_2EDTA Í $2H_2O$	5.000	2.000	–	–
$FeSO_4$Í $7H_2O$	1.991	2.000	–	–
Раствори Na_2EDTA и $FeSO_4$ се припремају одвојено, споје и одмах аутоклавирају. То даје:				
21 Fe-EDTA Раствор		1.000 пута	20,0	5,0

Медијуми М4 и М7

Медијуми М4 и М7 припремају се од раствора II, макронутријената и витаминима на следећи начин:

	Количина која се додаје у воду (mg/l)	Концентрација (у поређењу са медијумом М4) пута	За припремање комбинованог раствора II - додати следећу количину основног раствора I у воду (ml/L)	
			М 4	М 7
Комбиновани раствор II Елементи у траговима		20	50	50
Основни раствор са макронутријентима (појединачне супстанца)				
$CaCl_2$Í$2H_2O$	293.800	1.000	1,0	1,0
$MgSO_4$Í$7H_2O$	246.600	2.000	0,5	0,5
KCl	58.000	10.000	0,1	0,1
$NaHCO_3$	64.800	1.000	1,0	1,0
Na_2SiO_3Í$9H_2O$	50.000	5.000	0,2	0,2
$NaNO_3$	2.740	10.000	0,1	0,1
KH_2PO_4	1.430	10.000	0,1	0,1
K_2HPO_4	1.840	10.000	0,1	0,1
Комбиновани раствор са	–	10.000	0,1	0,1

витаминима				
Комбиновани раствор са витаминима се припрема додавањем 3 витамина у 1 литру воде како је приказано доле:				
Тиамин хидрохлорид	750	10.000	–	–
Цијанкобаламин (B12)	10	10.000	–	–
Биотин	7,5	10.000	–	–

Комбиновани раствор са витаминима се чува замрзнут у малим порцијама. Витамини се додају медијуму непосредно пре употребе.

Напомена 1: Да би се приликом припреме комплетног медија избегло таложење соли, аликвоте основних раствора додавати у око 500 до 800 ml дејонизоване воде и потом допунити до 1 L.

Напомена 2: Рецептура за припрему медијума M4 први пут је објављена у „Elendt, B.P. (1990). Selenium deficiency in crustacea; an ultrastructuralapproach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. Protoplasma, 154, p. 25-33."

Део трећи

АНАЛИЗА УКУПНОГ ОРГАНСКОГ УГЉЕНИКА (TOC) И ИЗРАДА НОМОГРАМА ЗА ОДРЕЂИВАЊЕ САДРЖАЈА TOC У ХРАНИ ОД АЛГИ

Садржај угљеника у храни од алги у нормалним околностима не одређује се директно, већ на основу поређења (тј. номограма), мерењем сурогат показатеља попут броја алгалних ћелија или апсорбанце светла.

TOC мерити методом оксидације при високој температури[XXXI], а не UV или персулфатном методом.

За израду номограма, алге центрифугирањем одвојити од хранљиве подлоге и потом ресуспендовати у дестилованој води. У сваком узорку, у трипликату, измерити сурогат показатељ и концентрацију TOC. Као слепа проба узима се дестилована вода. Одређује се и концентрација TOC у дестилованој води, која се затим одузме од концентрацијеTOC добијене из узорака алги.

Номограм је линеаран у опсегу предвиђених концентрација угљеника. У наставку су дати примери.

Напомена 1: Примери се не користе за прерачунавање – свака лабораторија израђује сопствени номограм.

_____

XXXI The Instrumental Determination of Total Organic Carbon, Total Oxygen Demand and Related Determinands 1979, HMSO 1980; 49 High Holborn, London WC1V 6HB

Слика 1:

Слика 2:

Слика 3:

Део четврти

ПРИМЕР ОБРАСЦА СА ПОДАЦИМА О ПРОМЕНИ МЕДИЈУМА, ПРАЋЕЊУ ФИЗИЧКО-ХЕМИЈСКИХ СВОЈСТАВА, ИСХРАНИ, РАЗМНОЖАВАЊУ ДАФНИЈА И СМРТНОСТИ ОДРАСЛИХ ЈЕДИНКИ

Експеримент бр:	Датум почетка:	Клон:	Медијум:	Врста хране:	Испитивана супстанца:	Номинална конц.:

Дан	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21		
Промена медијума																								
pH[XXXII]																							2. мерење	
																							1. мерење	
O_2 mg/l[XXVIII]																							2. мерење	
																							1. мерење	
Температура(°C)[XXVII]																							2. мерење	
																							1. мерење	

Храна дата (штиклирати)																								
Број живих потомака[XXXIII]																								Укупно
Посуда 1																								
2																								
3																								
4																								
5																								
6																								
7																								
8																								
9																								
10																								
																								Укупно
Кумулативна смртност одраслих јединки[XXXIV]																								

_____

XXXII Назначити која посуда се користила за тестирање.

XXXIII Навести смртност одраслих јединки као „М" у одговарајуће поље.

XXXIV Навести одбачена легла као „о.л." у одговарајућа поља

Део пети
ПРИМЕР ОБРАСЦА СА ПОДАЦИМА О РЕЗУЛТАТИМА ХЕМИЈСКИХ АНАЛИЗА

Измерене концентрације

Номинална концентрација	Узорак 1. седмице		Узорак 2. седмице		Узорак 3. седмице	
	Ново	Старо	Ново	Старо	Ново	Старо

Измерене концентрације као проценат номиналне

Номинална концентрација	Узорак 1. седмице		Узорак 2. седмице		Узорак 3. седмице	
	Ново	Старо	Ново	Старо	Ново	Старо

Део шести
ИЗРАЧУНАВАЊЕ СРЕДЊЕ ВРЕДНОСТИ КОНЦЕНТРАЦИЈЕ У ФУНКЦИЈИ ВРЕМЕНА

Тежинска средња вредност у функцији времена

Ако се узме да се концентрација испитиване супстанце може смањити између две промене медијума, важно је одредити која ће концентрација представљати опсег концентрација којима је родитељска јединка била изложена. Избор се базира на биолошким и статистичким показатељима. На пример, ако се закључи да на способност размножавања највише утиче највиша концентрација испитиване супстанце, онда се највиша концентрација и узима. Ако се закључи да су важнији ефекти који се акумулирају или да је важније дугорочно деловање, онда је меродавнија просечна концентрација. У том случају примереније је служити се тежинском средњом вредношћу концентрације у функцији времена, јер се тако узимају у обзир и колебања концентрације која се збивају у току времена.

Слика 1: Пример тежинске средње вредности

Слика 1 приказује (поједностављен) пример испитивања које траје 7 дана са просечном променом медијума нултог, 2. и 4. дана:

– танка цик-цак црта приказује концентрацију у било којој временској тачки. Претпоставка је да се смањење концентрације збива по експоненцијалном обрасцу.

– шест уцртаних тачака представљају концентрације измерене на почетку и на крају сваког раздобља промене медијума.

– пуна дебела црта показује положај тежинске средње вредности у функцији времена.

Тежинска средња вредност у функцији времена рачуна се тако да се узме да је површина испод криве средње вредности у току времена једнака површини испод криве концентрације. Начин рачунања у горњем примеру приказан је у Табели 1.

Табела 1: Израчунавање тежинске средње вредности у функцији времена

Број промена медијума	Дани	$Conc_0$	$Conc_1$	$\ln(Conc_0)$	$\ln(Conc_1)$	Површина
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
Укупни дани: 7					Укупна површина	50,091
					Тежинска средња вредност	7,156

Дани означавају број дана у раздобљу једне промене медијума.

$Conc_0$ јесте концентрација измерена на почетку сваког раздобља промене медијума.

$Conc_1$ јесте концентрација измерена на крају сваког раздобља промене медијума.

$\ln(Conc_0)$ јесте природни логаритам $Conc_0$.

$\ln(Conc_1)$ јесте природни логаритам $Conc_1$.

Површина јесте површина испод експоненцијалне криве за свако раздобље промене медијума, рачуна се:

$$\text{Површина} = \frac{Conc_0 - Conc_1}{\ln(Conc_0) - \ln(Conc_1)} \times \text{Дани}$$

Тежинска средња вредност јесте укупна површина подељена укупним данима.

За испитивање токсичности по репродукцију дафније табела обухвата 21 дан испитивања.

Ако се мерења обављају само на почетку и на крају раздобља промене медијума, није могуће потврдити да је процес смањивања концентрације испитиване супстанце заправо експоненцијалан. Ако крива изгледа другачије, мења се и вредност површине. Експоненцијални образац смањивања концентрације испитиване супстанце није неприхватљив и то је вероватно најупотребљивија крива у недостатку других података.

Неопходан је опрез ако се хемијском анализом на крају раздобља промене медијума испитивана супстанца не нађе. Осим ако је могуће мерити којом брзином супстанца нестаје из раствора, нема начина да се добије веродостојна површина испод криве, те је у том случају заправо немогуће добити смислену средњу вредност у функцији времена.

C.21. ЗЕМЉИШНИ МИКРООРГАНИЗМИ: ИСПИТИВАЊЕ ТРАНСФОРМАЦИЈЕ АЗОТА

1. МЕТОДА ИСПИТИВАЊА

Метода се заснива на Упутству за испитивање OECD 216 (2000).

1.1. УВОД

Ова метода испитивања описује лабораторијску методу за процену дугорочних ефеката хемикалија на процес микробиолошке трансформације азота у земљишту, при једнократном излагању. Метода се базира на препорукама Европске и Медитеранске Организације за заштиту биља[1]. Узете су у обзир и смернице Немачког државног института за биологију[2], Америчке агенције за заштиту животне средине[3], SETAC[4] и Међународне организације за стандардизацију[5]. На OECD радионици на тему избора земљишта/седимента[6] постигнут је договор о броју и типу земљишта за потребе овог испитивања. Препоруке за сакупљање, руковање и складиштење узорака земљишта базирају се на ISO стандарду[7] и препорукама са радионице. У процени и евалуацији токсичних својстава испитиване супстанце, у неким случајевима је потребно одредити њихов утицај на активност земљишних микроорганизама. Рецимо када су потребни подаци о могућем негативном деловању средстава за заштиту биља на земљишну микрофлору, или када се очекује изложеност земљишних микроорганизама другим хемикалијама. Испитивање трансформације азота служи за процену ефеката таквих хемикалија на земљишне микроорганизме. Ако се испитују агрохемикалије (средства за заштиту биља, ђубрива, хемикалије у шумарству) изводи се и испитивање трансформације угљеника упоредо са испитивањем трансфромације азота. Ако се испитују хемикалије које се не користе у пољопривредне сврхе, испитивање трансформације азота је довољно. Уколико се вредност EC_{50} добијена из испитивања трансформације азота за дате хемикалије налази у опсегу EC_{50} вредности које су утврђене за комерцијално доступне инхибиторе нитрификације (нпр. нитрапирин), може се извести испитивање трансформације угљеника да би се добило више података.

Земљиште се састоји од живе и неживе компоненте које егзистирају у комплексним и хетерогеним смешама. Микроорганизми играју важну улогу у разградњи и трансформацији органске материје. У плодним земљиштима, велики број врста микроорганизама доприноси различитим аспектима плодности земљишта. Било какав дугорочни утицај на ове биохемијске процесе може потенцијално утицати на процесе кружења нутријената, што може утицати на плодност земљишта. Трансформација угљеника и азота одвија се у свим типовима плодних земљишта. Иако се микробиолошке заједнице разликују од земљишта до земљишта, путеви трансформације нутријената су у основи исти.

Ова метода испитивања служи за процену дугорочних негативних ефеката супстанци на процес трансформације азота у аеробним површинским слојевима земљишта. Метода омогућава и процену ефекта супстанце на трансформацију угљеника од стране земљишних микроорганизама. Образовање нитрата се догађа након прекидања хемијске везе угљеник-азот. Ако су забележене исте брзине образовања нитрата у третманима и у контроли, може се претпоставити да не постоји негативан утицај на главне путеве разградње угљеника. Супстрат за потребе испитивања (храниво од луцерке у праху) има повољан однос угљеник/азот (обично између 12/1 и 16/1). Захваљујући томе, довољна количина угљеника је на располагању микроорганизмима у току испитивања, а уколико се испољи негативно дејство хемикалија на микробну заједницу, могу се опоравити у периоду од 100 дана.

Испитивања на којима се заснива ова метода примарно су била осмишљена за супстанце за које се може проценити у којој количини доспевају у земљиште. То је нпр. случај са средствима за заштиту биља за које је познат режим примене. Кад је реч о агрохемикалијама довољно је испитивање две дозе које одговарају очекиваном или предвиђеном режиму примене у пољу. Агрохемикалије се могу испитивати као активни састојци или као формулације. Испитивање није ограничено само на агрохемикалије. Променом количине испитиване супстанце примењене на земљиште и начина на који се подаци евалуирају могу се испитивати и хемикалије за које није познато у којој количини доспевају до земљишта. За хемикалије које нису агрохемикалије, одређује се серија концентрација и испитује њихов ефекат на трансформацију азота. Подаци из ових испитивања користе се за добијање криве дозне зависности и за процену EC_x вредности, где је *x* унапред дефинисани проценат ефекта.

1.2. ДЕФИНИЦИЈЕ

Трансформација азота јесте потпуна микробиолошка разградња органске материје која садржи азот, преко процеса стварања амонијака и нитрита до образовања нитрата.

Ефективна концентрација (у даљем тексту: EC_x) јесте концентрација испитиване супстанце у земљишту за коју се процењује инхибиција трансформације азота у нитрате за унапред дефинисан проценат *x*.

Средња ефективна концентрација (у даљем тексту: EC_{50}) јесте концентрација испитиване супстанце у земљишту за коју се процењује 50% инхибиција трансформације азота у нитрате.

1.3. РЕФЕРЕНТНЕ СУПСТАНЦЕ

За ову методу испитивања нису прописане референтне супстанце.

1.4. ПРИНЦИП МЕТОДЕ

Просејано земљиште обогаћује се биљним хранивом у праху и затим се третира са испитиваном супстанцом или остави нетретирано (контрола). Ако се испитују агрохемикалије, препоручује се испитивање минимално две концентрације испитиване супстанце и оне да буду одређене у односу на највећу концентрацију очекивану на њивама. Након 0, 7, 14 и 28 дана инкубације, узорци земљишта за испитивану и контролну групу се екстрахују са одговарајућим растварачем и одређује се количина азота у екстрактима. Брзина образовања азота у испитиваним групама пореди се са брзином образовања у контролним групама и израчунава се проценат одступања у односу на контролу. Сва испитивања трају најмање 28 дана. Ако

је 28. дана разлика између испитиваних и контролних група једнака или већа од 25%, испитивање се продужује до максимално 100 дана. Ако се испитују хемикалије које нису агрохемикалије, испитивана супстанца се додаје узорцима земљишта у серији концентрација и мери се количина образованог азота у испитиваним и контролних групама након 28 дана инкубације. Резултати испитивања са више концентрација испитиване супстанце анализирају се регресионом анализом и израчунавају се EC_x вредности (нпр. EC_{50}, EC_{25}, односно EC_{10}).

1.5. ВАЛИДНОСТ ИСПИТИВАЊА

Процене резултата добијених испитивањем агрохемикалија базирају се на релативно малим разликама (нпр. просечна вредност ± 25%) између концентрација нитрата у испитиваним и контролних групама, па велики проценат варијације резултата у контролним групама може довести до погрешних резултата. Варијације у контроли да буду мање од ± 15%.

1.6. ОПИС МЕТОДЕ

1.6.1. Опрема

Користе се посуде направљене од хемијски инертног материјала. Посуде да буду одговарајуће запремине у складу са процедуром за инкубацију земљишта, нпр. инкубација јединственог узорка или у серији појединачних узорака земљишта (видети одељак 1.7.1.2. ове методе). Треба предузети мере за смањење губитка воде и обезбедити несметану размену гасова у току испитивања (нпр. посуде се могу прекрити перфорираном полиетиленском фолијом). При испитивању испарљивих супстанци користе се посуде које се могу херметички затворити. Запремина посуда да буде четири пута већа од запремине самог узорка земљишта

Поред стандардне лабораторијске апаратуре користе се:

– мешалица (механички уређај или друга одговарајућа опрема);

– центрифуга (3.000 g) или уређај за филтрацију (филтер папир без нитрата);

– уређај за анализу нитрата одговарајуће осетљивости и поновљивости мерења.

1.6.2. Избор и број врста земљишта

Користи се једна врста земљишта. Препоручена својства земљишта су:

– садржај песка не мањи од 50% и не већи од 75%;

– pH вредност 5,5 до 7,5;

– садржај органског угљеника 0,5% до 1,5%;

– најмање 1% укупног садржаја органског угљеника у земљишту потиче из микробиолошке биомасе[8, 9] коју је потребно измерити.

У већини случајева овакав састав земљишта одликују најлошија својства, с обзиром на то да је адсорпција испитиване супстанце минимална, а њена биодоступност максимална. Према томе, испитивања са другим типовима земљишта нису неопходна. Ипак у одређеним случајевима, нпр. када се очекује највиша примена испитиване супстанце на посебним типовима земљишта попут киселих шумских земљишта, или су у питању хемикалије са електростатичким набојем, постоји потреба за додатним испитивањем и других врста земљишта.

1.6.3. Сакупљање и складиштење узорака земљишта

1.6.3.1. Сакупљање

Потребно је располагати детаљним подацима о локалитету са ког су узети узорци земљишта за потребе испитивања. Подаци укључују тачну локацију узорковања, биљни покривач, датуме примене средстава за заштиту биља, третмане са органским и неорганским ђубривима, употребу биолошких материјала или контаминације услед несрећног случаја. Место изабрано за узимање узорака земљишта омогућава дуготрајну употребу. Погодни локалитети за узорковање су трајни пашњаци, њиве под једногодишњим житарицама (осим кукуруза), или густо засејане, нађубрене површине. Изабрани локалитет не сме бити третиран никаквим органским ђубривом најмање шест месеци. Употреба минералних ђубрива је прихватљива само у количини потребној за нормалан раст и развој биља, а узорци земљишта се могу узимати најмање три месеца након примене ђубрива. Треба избегавати испитивање земљишта третираног ђубривима са познатим биоцидним ефектима, нпр. калцијум-цијанамидом.

Узорковање избегавати у току или непосредно након дугих периода суше (дужих од 30 дана) или задржавања воде. За преорана земљишта узимати узорке са дубине од 0 cm до 20 cm. За травњаке (пашњаке) или друга земљишта која нису дуже време орана (најмање једну сезону), максимална дубина узорковања може бити нешто виша од 20 cm, нпр. до 25 cm).

Узорке земљишта транспортовати у одговарајућим посудама и температурним условима који омогућавају непромењивост својства земљишта у току транспорта.

1.6.3.2. Складиштење

Пожељно је испитивати узорке земљишта непосредно након узорковања. Уколико се узорци не могу одмах испитивати, складиште се у мраку на температури од 4° C ± 2° C, максимум три месеца. У току складиштења обезбедити аеробне услове. Ако се узорци земљишта узимају са места где је земљиште смрзнуто најмање три месеца у току године, размотрити

складиштење узорка на температури од - 18° C до - 22° C. Микробиолошка биомаса складиштених узорака земљишта мери се пре почетка сваког испитивања, а садржај угљеника у биомаси је најмање 1% укупног органског угљеника у земљишту (видети одељак 1.6.2. ове методе).

1.6.4. Руковање и припрема узорака земљишта за испитивање

1.6.4.1. Прединкубација

Ако су узорци земљишта складиштени (видети одељак 1.6.3.2. ове методе), препоручује се прединкубација у трајању од 2 до 28 дана. Температура и садржај влаге у узорцима у току прединкубације да буду приближни захтевима испитивања (видети одељак 1.6.4.2. и 1.7.1.3. ове методе).

1.6.4.2. Физичка и хемијска својства

Узорци земљишта се ручно чисте од великих предмета (нпр. камење, делови биљака, итд) и мокро просејавају без сувишног сушења на честице величине мање или једнаке од 2 mm. Садржај влаге у узорку земљишта подесити дестилованом или дејонизованом водом на вредност између 40% и 60% максималног капацитета задржавања воде.

1.6.4.3. Обогаћивање органским супстратом

Земљиште обогатити одговарајућим органским супстратом, нпр. хранивом од луцерке у праху (главни састојак: *Medicago sativa*) са односом C/N између 12/1 и 16/1. Препоручен однос луцерке и земљишта је 5 g луцерке по килограму земљишта (суве тежине).

1.6.5. Припрема испитиване супстанце за испитивање на узорцима земљишта

Испитивана супстанца се обично примењује уз употребу носача. Носач може бити вода (за супстанце растворљиве у води) или инертни материјал попут финог кварцног песка (величина честица: 0,1 mm до 0,5 mm). Треба избегавати употребу течних носача, осим воде (нпр. органски растварачи као ацетон, хлороформ) с обзиром на то да делују негативно на микрофлору. Уколико се користи песак као носач, може се прекрити са испитиваном супстанцом растворeном или суспендованом у одговарајући растварач. У таквим случајевима, растварач уклонити испаравањем пре мешања са земљиштем. За оптималну дистрибуцију испитиване супстанце у земљишту, препоручује се однос од 10 g песка по килограму земљишта (суве тежине). Контролни узорци се третирају само са еквивалентном количином воде, односно кварцног песка.

Код испитивања испарљивих супстанци избегавати губитке у току испитивања и омогућити њену хомогену расподелу у земљишту (нпр. испитивану супстанцу инјектирати у земљиште на неколико места).

1.6.6. Концентрације испитиване супстанце

Ако се испутују агрохемикалије, користити најмање две концентрације испитиване супстанце. Нижа концентрација одговара најмање максималној количини испитиване супстанце за коју се очекује да ће доспети до земљишта у реалним условима, док је виша концентрација умножак ниже концентрације. Концентрације испитиване супстанце додате узорцима земљишта израчунавају се уз претпоставку да је она равномерно расподељена до дубине од 5 cm и да је густина земљишта 1,5. За агрохемикалије које се примењују директно на земљиште, или за хемикалије за које се може предвидети количина која доспева до земљишта, препоручене концентрације за испитивање су максимална предвидљива концентрација у животној средини (Predictable Environmental Concentration, у даљем тексту: PEC) и концентрације пет пута веће од вредности PEC. Супстанце које ће бити примењене на земљиште више пута у једној сезони испитивати у концентрацијама добијеним множењем вредности PEC са максималним бројем предвиђених примена. Ипак, виша концентрација не сме бити већа од десетоструке вредности највеће примењене концентрације по појединачној примени. Ако се испитују хемикалије које нису агрохемикалије. Користи се геометријска серија од најмање пет концентрација испитиване супстанце. Концентрације испитиване супстанце покривају опсег потребан за одређивање EC_x вредности.

1.7. ИЗВОЂЕЊЕ ИСПИТИВАЊА

1.7.1. Услови изложеност

1.7.1.1. Испитиване и контролне групе

Уколико се испитују агрохемикалије, земљишта се дели у три узорка једнаке тежине. Два узорка се мешају са носачем који садржи испитивану супстанцу, а трећи са носачем без испитиване супстанце (контрола). Препоручују се минимално три понављања за сваки узорак, са и без испитиване супстанце. Ако се испитују хемикалије које нису агрохемикалије, земљиште се дели у шест узорака једнаке тежине. Пет узорака се меша са носачем који садржи испитивану супстанцу, а шести са носачем без испитиване супстанце. Препоручају се три понављања по сваком узорку, са и без испитиване супстанце. Треба омогућити хомогену расподелу супстанце у испитиваним узорцима земљишта. Током мешања избегавати пресовање или гњечење земљишта.

1.7.1.2. Инкубација узорака земљишта

Разликују се два начина инкубација узорака земљишта зависно од тога да ли су у питању јединствени узорци сваког испитиваног и сваког контролног узорка земљишта или серије појединачних подузорака једнаке величине за испитиване и за контролне узорке земљишта. У случају испарљивих супстанци испитивање, ипак, извести само са серијама појединачних подузорака. Када се земљиште инкубира као један јединствени узорак, припремају се велике количине земљишта за испитиване и контролне групе и по потреби узимају се подузорци и анализирају. Количина иницијално припремљених узорака за експерименталне и контролне групе зависи од величине подузорака, броја понављања и предвиђеног

максималног броја узорковања. Земљишта инкубирана као јединствени узорак добро промешати пре узимања подузорака. Када се узорци инкубирају у серији појединачних подузорака земљишта, основни узорак за испитиване и контролне узорке дели се на тражени број подузорака и они се користе по потреби. У испитивањима где се може очекивати више од два узорковања, обезбедити довољан број подузорака који може да буде довољан за сва понављања и свако узорковање. Треба урадити најмање три понављања по концентрацији испитиване супстанце и инкубирати у аеробним условима (видети одељак 1.7.1.1. ове методе). Током свих испитивања, користити адекватне посуде које онемогућавају развијање анаеробних услова. У случају испарљивих супстанци, испитивање се изводи само са серијом појединачних подузорака.

1.7.1.3. Услови и трајање испитивања

Испитивање се врши у мраку на температури 20° C ± 2° C. Садржај влаге у узорцима земљишта одржавати између 40% и 60% максималног капацитета задржавања воде у земљишту (видети одељак 1.6.4.2. ове методе) са одступањима од ± 5%. По потреби, може се додавати дестилована, дејонизована вода.

Минимално трајање испитивања је 28 дана. Ако се испитују агрохемикалије, упоређују се брзине стварања нитрата у испитиваним групама у односу на контролу. Ако се 28. дана ове вредности разликују за више од 25% испитивање се наставља док се не постигне разлика ≤ 25% или максимално до 100 дана, зависно који услов се пре испуни. Ако се испитују хемикалије које нису агрохемикалије, испитивање се прекида након 28 дана. Тада се одређују количине нитрата у испитиваним и контролним узорцима земљишта и израчунава EC_x вредност.

1.7.2. Узорковање и анализа земљишта

1.7.2.1. Шема узорковања земљишта

Уколико се испитују агрохемикалије, одређује се садржај нитрата у узорцима земљишта на почетку испитивања, 7, 14. и 28. дана. Ако је потребно продужити испитивање, обавити додатна мерења сваких 14 дана након 28. дана.

Ако се испитују супстанце које нису агрохемикалије, испитује се најмање пет концентрација испитиване супстанце и садржај нитрата се одређује у узорцима земљишта на почетку (дан 0) и на крају периода излагања (28. дан). Уколико се покаже потребним додатно мерење се може обавити средином тог периода, нпр. седмог дана. Подаци добијени 28. дана користе се у одређивању EC_x вредности за дату хемикалију. Подаци добијени из контролних узорака на почетку испитивања могу се користити и у процењивању садржаја нитрата у земљишту.

1.7.2.2. Анализа узорака земљишта

Количина образованог азота у сваком понављању за узорке земљишта испитиване и контролне групе одређује се при сваком времену узорковања. Нитрати се екстрахују из земљишта мешањем узорака са одговарајућим екстракционим средствима, нпр. 0,1 M раствор калијум хлорида. Препоручује се однос од 5 ml раствора KCl по граму суве тежине еквивалента земљишта. Да би екстракција била оптимална, посуде са земљиштем и екстракционим средством не треба да буду напуњене више од половине. Смеше се мешају на 150 rpm 60 минута. Смеше се центрифугирају или филтрирају и у супернатанту се одређује садржај нитрата. Супернатант се може пре анализе чувати до шест месеци на –20° C ± 5° C.

2. ПОДАЦИ

2.1. ОБРАДА РЕЗУЛТАТА

Ако се испитују агрохемикалије, бележи се количина образованог азота у сваком подузорку земљишта, а средње вредности свих подузорака за контролну и испитивану групу приказати табеларно. Брзина трансформације азота одређује се одговарајућим и опште прихватљивим статистичким методама (F-тест, ниво значаја 5%). Количина образованог азота изражава се у mg азота/kg суве тежине земљишта/дан. Брзина стварања азота у свакој испитиваној групи пореди се са контролном групом и рачуна се проценат одступања од контроле.

Ако се испитују хемикалије које нису агрохемикалије, одређују се количине образованог азота у сваком подузорку и прави се крива дозне зависности за процену EC_x вредности. Количине азота (нпр. mg азота/kg суве тежине земљишта) у испитиваним групама након 28 дана пореде се са количином азота насталом у контроли. Из тих података се рачуна проценат инхибиције за сваку концентрацију испитиване супстанце. Вредности процената инхибиције приказују се графички у функцији концентрација испитиване супстанце, а за одређивање EC_x вредности користе се статистичке процедуре. Интервали поверења (p = 0,95) за израчунате EC_x одређују се и путем стандардних процедура[10, 11, 12].

Супстанце које садрже високе количине азота доприносе количини азота која настаје у току испитивања. Ако се те супстанце испитују у вишој концентрацији (хемикалије за које се очекује да ће се примењивати у више наврата), у испитивање укључити одговарајуће контроле (нпр. земљиште са испитиваном супстанцом, али без биљног хранива). Податке из тих контрола узети у обзир при рачунању EC_x вредности.

2.2. ТУМАЧЕЊЕ РЕЗУЛТАТА

Када се процењују резултати испитивања са агрохемикалијама и кад је разлика у брзини стварања азота између прве испитиване групе у серији (максимална предвиђена концентрација) и контроле ≤ 25% у било којем времену узорковања након 28. дана, за дате хемикалије се може оценити да немају дугорочни утицај на трансформацију азота у земљишту. Када се процењују резултати добијени испитивањем супстанци које нису агрохемикалије, користе се EC_{50}, EC_{25}, односно EC_{10} вредности.

3. ИЗВЕШТАЈ

Извештај о испитивању садржи:

1) потпуну идентификацију коришћеног земљишта, укључујући:

– географске одреднице места (географска ширина и дужина);

– податке о историји места (нпр. биљни покривач, третмани средствима за заштиту биља, третмани ђубривима, акцедентне контаминације итд.);

– употреба земљишта (нпр. пољопривредно земљиште, шума итд.);

– дубина узорковања (cm);

– садржај песка/муља/глине (% суве тежине);

– pH вредности (у води);

– садржај органског угљеника (% суве тежине);

– садржај азота (% суве тежине);

– почетна концентрација азота (mg азота/kg суве тежине);

– јонско измењивачки капацитет (mmol/kg);

– почетна биомаса микроорганизама у процентима у односу на укупан органски угљеник;

– референце свих метода коришћених за одређивање сваког параметра;

– сви подаци у вези са сакупљањем и складиштењем узорака земљишта;

– детаљи о прединкубацији, ако постоје.

2) податке о испитиваној супстанци:

– физичка својства и где је битно, физичка и хемијска својства;

– подаци за хемијску идентификацију, где је битно, укључујући структурну формулу, степен чистоће (нпр. за средства за заштиту биља, проценат активног састојка), садржај азота.

3) податке о супстрату:

– порекло супстрата;

– састав (нпр. хранива са луцерком);

– садржај угљеника, азота (% суве тежине);

– величина сита (mm).

4) податке о условима испитивања:

– опис начина обогаћивања земљишта органским супстратом;

– број концентрација испитиване супстанце и где је прикладно, оправдање за избор датих концентрација;

– опис увођења испитиване супстанце у земљиште;

– температура инкубације;

– садржај влаге у земљишту на почетку и у току испитивања;

– коришћена метода инкубације земљишта (нпр. као јединствени узорак или као серија појединачних подузорака);

– број понављања;

– број узорковања;

– метода коришћена за екстракцију азота из земљишта;

5) податке о резултатима:

– процедуре и опрема за аналитичко одређивање азота;

– табеларни подаци укључујући појединачне и средње вредности за мерење азота;

– варијанса у контролним и експерименталним групама;

– објашњене корекција у израчунавању, уколико је битно;

– проценат разлике брзине стварања азота при сваком времену узорковања, или, ако је прикладно, EC_{50} са 95% интервалима поверења, друге EC_x вредности (нпр. EC_{25} или EC_{10}) са интервалима поузданости и график криве дозне зависности;

– статистичка обрада резултата;

– све додатне податке и опажања потребне за тумачење резултата.

4. ЛИТЕРАТУРА

1. EPPO, (1994) Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant ProtectionChemicals. 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 PlantProtection Products, VI, 1-1 (2nd eds., 1990).

3. EPA (1987) Soil Microbial Community Toxicity Test. EPA 40 CFR Part 797.3700. Toxic SubstancesControl Act Test Guidelines; Proposed rule. September 28, 1987.

4. SETAC-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 inSoils and the Influence of Chemicals on these Processes. Technical Committee ISO/TC 190/SC 4: SoilQuality – 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 soilfor the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.

8. ISO 14240-1, (1997) Soil quality – Determination of soil microbial biomass – Part 1: Substrateinducedrespiration method.

9. ISO 14240-2, (1997) Soil quality – Determination of soil microbial biomass – Part 2: Fumigationextractionmethod.

10. Litchfield, J.T. and Wilcoxon F., (1949) A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour.Pharmacol. and Exper. Ther., 96, p. 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. ЗЕМЉИШНИ МИКРООРГАНИЗМИ: ИСПИТИВАЊЕ ТРАНСФОРМАЦИЈЕ УГЉЕНИКА

Метода се заснива на Упутству за испитивање OECD 217 (2000).

1.1. УВОД

Ова метода испитивања описује лабораторијски поступак за процену дугорочних потенцијалних ефеката средстава за заштиту биља и, ако је могуће, других хемикалија на активност трансформације угљеника од стране земљишних микроорганизама при једнократном излагању. Метода се базира на препорукама Европске и Медитеранске Организације за заштиту биља (European and Mediterranean Plant Protection Organization)[1]. Узете су у обзир и друге смернице, укључујући смернице Немачког државног института за биологију (Biologische Bundesanstalt)[2], Америчке агенције за заштиту животне средине (US Environmental Protection Agency)[3] и SETAC[4]. На OECD радионици на тему избора земљишта/седимента[5] постигнут је договор о броју и типу земљишта за потребе овог испитивања. Препоруке за сакупљање, руковање и складиштење узорака земљишта темеље се на ISO стандарду[6] и препорукама радионице.

У процени и евалуацији токсичних ефеката испитиване супстанце, утврђивање ефекта на активност земљишних микроорганизама може бити неопходно, нпр. када се траже подаци о могућем негативном деловању средстава за заштиту биља на земљишну микрофлору или када се очекује изложеност земљишних микроорганизама другим хемикалијама које не спадају у средства за заштиту биља. Испитивање трансформације угљеника изводи се у циљу процене ефекта хемикалија на земљишну микрофлору. Ако се испитују агрохемикалије (нпр. средства за заштиту биља, ђубрива, хемикалије у шумарству), изводи се и испитивање трансформације угљеника и трансформације азота. Ако се испитују друге хемикалије, испитивање трансформације азота је довољно. Уколико се вредност EC_{50} добијена из испитивања трансформације азота за дате хемикалије налази у опсегу EC_{50} вредности које су утврђене за комерцијално доступне инхибиторе нитрификације (нпр. нитрапурин), може се извести испитивање трансформације угљеника да би се добило више података.

Земљиште се састоји од живе и неживе компоненте које егзистирају у комплексним и хетерогеним смешама. Микроорганизми играју важну улогу у разградњи и трансформацији органске материје. У плодним земљиштима са великим бројем врста, микроорганизми доприносе различитим аспектима плодности земљишта. Било какав дугорочни утицај на биохемијске процесе може потенцијално одразити на процесе кружења нутријената, а ово опет на плодност земљишта. Трансформација угљеника и азота одвија се у свим типовима плодних земљишта. Иако се микробиолошке заједнице разликују од земљишта до земљишта, путеви трансформације нутријената су у основи исти.

Ова метода испитивања служи за процену дугорочних негативних ефеката супстанци на процес трансформације угљеника у аеробним површинским слојевима земљишта. Метода је довољно осетљива да детектује промене у величини и активности микробних заједница које су одговорне за трансформацију угљеника с обзиром на то да су овим испитивањем те заједнице изложене стресу услед излагања хемикалијама и стресу због смањене количине угљеника. За потребе испитивања користи се песковито земљиште са ниским садржајем органске материје. Земљиште се третира са испитиваном супстанцом и инкубира у условима који омогућавају брз микробиолошки метаболизам. У оваквим условима извори расположивог угљеника

у земљишту брзо се исцрпљују. Смањење количине расположивог угљеника на крају доводи до нестанка микроорганизама или наступа фаза дорманције, односно спорулације. Ако испитивање траје више од 28 дана, последице ових реакција могу се мерити у контроли (нетретирано земљиште) као прогресиван губитак метаболички активне микробиолошке биомасе[7]. Ако на биомасу микроорганизама са смањеном количином расположивог угљеника у земљишту, у условима дефинисаним за ову методу, делује испитивана супстанца, опоравак можда није могућ. У већини случајева негативни утицаји узроковани испитиваном супстанцом у било ком моменту испитивања, трају до краја испитивања.

Испитивања на којима се заснива ова метода примарно су била осмишљена за супстанце за које се може проценити у којој количини могу доспети у земљиште. То је случај код средстава за заштиту биља са познатим режимом примене. За агрохемикалије, довољно је испитивање две дозе које одговарају очекиваном или предвиђеном режиму примене у пољу. Агрохемикалије се могу испитивати као активни састојци или као формулације. Испитивање није ограничено само на хемикалије за које се могу предвидети њихове концентрације у животној средини. Променом количине испитиване супстанце примењене на земљиште и начина на који се подаци процењују, испитивање се може користити и за хемикалије за које се не зна у којој количини доспевају до земљишта. За хемикалије које нису агрохемикалије, одређује се серија концентрација и испитује њихов ефекат на трансформацију угљеника. Подаци из ових испитивања користе се за добијање криве дозне зависности и за процену EC_x вредности, где је *x* унапред дефинисан проценат ефекта.

1.2. ДЕФИНИЦИЈЕ

Трансформација угљеника јесте микробиолошка разградња органске материје у угљен-диоксид.

Ефективна концентрација (у даљем тексту: EC_x) јесте концентрација испитиване супстанце у земљишту за коју се процењује инхибиција трансформације угљеника у угљен-диоксид за унапред дефинисан проценат инхибиције x.

Средња ефективна концентрација (у даљем тексту: EC_{50}) јесте концентрација испитиване супстанце у земљишту за коју се процењује 50% инхибиција трансформације угљеника у угљен-диоксид.

1.3. РЕФЕРЕНТНЕ СУПСТАНЦЕ

За ову методу испитивања нису одређене референтне супстанце.

1.4. ПРИНЦИП МЕТОДЕ

Просејано земљиште се третира испитиваном супстанцом или се остави нетретирано (контрола). Ако се испитују агрохемикалије, препоручује се испитивање најмање две концентрације испитиване супстанце и оне треба да буду одређене у односу на највећу концентрацију која ће се применити. Након 0, 7, 14 и 28 дана инкубације, узорци земљишта испитиване и контролне групу мешају се са глукозом и мери се брзина глукозом индуковане респирације за наредних 12 сати. Брзина респирације изражава се као ослобођени угљен-диоксид (mg угљен-диоксида/ kg сувог земљишта/h) или као утрошени кисеоник (mg кисеоника/kg земљишта/h). Средња вредност брзине респирације у испитиваним групама пореди се са брзином у контролним групама и израчунава се проценат смањења у односу на контролу. Сва испитивања се изводе у трајању најмање 28 дана.

Ако су 28. дана разлике у брзини респирације између испитиваних и контролних група ≥ 25%, мерења се настављају на сваких 14 дана у трајању највише до 100 дана. Ако су у питању супстанце које нису агрохемикалије, испитују се и додатне концентрације те супстанце (не само две) и мери се глукозом индукована брзина респирације (нпр. средња вредност ослобођеног угљен-диоксида или утрошеног кисеоника) након 28 дана. Резултати испитивања серије концентрација анализирају се коришћењем регресионих модела и израчунавају се EC_x вредности (нпр. EC_{50}, EC_{25},односно EC_{10}).

1.5. ВАЛИДНОСТ ИСПИТИВАЊА

Процене резултата добијених испитивањем агрохемикалија базирају се на релативно малим разликама (просечна вредност ± 25%) између ослобођеног угљен-диоксида или утрошеног кисеоника у испитиваним и контролним групама, па велики проценат варијације у контролним групама може узроковати погрешан резултат. Варијанса у контроли је мања од ± 15%.

1.6. ОПИС МЕТОДЕ

1.6.1. Опрема

Користе се посуде направљене од хемијски инертног материјала. Посуде да буду одговарајуће запремине у складу са поступком за инкубацију земљишта, нпр. инкубација јединственог узорка или у серији појединачних подузорака земљишта (видети одељак 1.7.1.2. ове методе). Предузети мере за смањење губитка воде и обезбедити несметану размену гасове у току испитивања (посуде се могу прекрити перфорираном полиетиленском фолијом). Када се испитују испарљиве супстанце, користити затворене посуде које се могу херметички затворити. Запремина посуда да буде четири пута већа од запремине самог узорка земљишта.

За одређивање глукозом индуковане респирације, потребни су системи за инкубацију и инструменти за мерење продукције угљен-диоксида или потрошње кисеоника. Примери таквих система и инструмената су у литератури[8, 9, 10, 11].

1.6.2. Избор и број врста земљишта

Користи се једна врста земљишта. Препоручена својства земљишта су:

– садржај песка не мањи од 50% и не већи од 75%;

– pH вредност 5,5 до 7,5;

– садржај органског угљеника 0,5% до 1,5%;

– најмање 1% укупног садржаја органског угљеника у земљишту потиче из микробиолошке биомасе[8, 9] коју је потребно измерити.

У већини случајева овакав састав земљишта одликују најлошија својства, с обзиром на то да је адсорпција испитиване супстанце минимална, а њена биодоступност максимална. Према томе, испитивања са другим типовима земљишта нису неопходна. Ипак у одређеним случајевима, нпр. када се очекује највиша примена испитиване супстанце на посебним типовима земљишта попут киселих шумских земљишта, или су у питању хемикалије са електростатичким набојем, постоји потреба за додатним испитивањем и других врста земљишта.

1.6.3. Сакупљање и складиштење узорака земљишта

1.6.3.1. Сакупљање

Потребно је располагати детаљним подацима о локалитету са ког су узети узорци земљишта за потребе испитивања. Подаци укључују тачну локацију узорковања, биљни покривач, датуме примене средстава за заштиту биља, третмане са органским и неорганским ђубривима, употребу биолошких материјала или контаминације услед несрећног случаја. Место изабрано за узимање узорака земљишта неопходно је да омогући дуготрајну употребу. Погодни локалитети за узорковање су трајни пашњаци, њиве под једногодишњим житарицама (осим кукуруза), или густо засејане, нађубрене површине. Изабрани локалитет не сме бити третиран никаквим органским ђубривом најмање шест месеци. Употреба минералних ђубрива је прихватљива само у количини потребној за нормалан раст и развој биља, а узорци земљишта се могу узимати најмање три месеца након примене ђубрива. Треба избегавати испитивање земљишта третираног ђубривима са познатим биоцидним ефектима, нпр. калцијум-цијанамидом.

Узорковање избегавати у току или непосредно након дугих периода суше (дужих од 30 дана), или задржавања воде. За преорана земљишта узимати узорке са дубине од 0 cm до 20 cm. За травњаке (пашњаке) или друга земљишта која нису дуже време орана (најмање једну сезону), максимална дубина узорковања може бити нешто виша од 20 cm, нпр. до 25 cm).

Узорке земљишта транспортовати у одговарајућим посудама и температурним условима који омогућавају непромењивост својства земљишта у току транспорта.

1.6.3.2. Складиштење

Пожељно је испитивати узорке земљишта непосредно након узорковања. Уколико се узорци не могу одмах испитивати, складиште се у мраку на температури од 4° C ± 2° C, максимум три месеца. У току складиштења обезбедити аеробне услове. Ако се узорци земљишта узимају са места где је земљиште смрзнуто најмање три месеца у току године, размотрити складиштење узорка на температури од - 18°C. Микробиолошка биомаса складиштених узорака земљишта мери се пре почетка сваког испитивања, а садржај угљеника у биомаси је најмање 1% укупног органског угљеника у земљишту (видети одељак 1.6.2. ове методе).

1.6.4. Руковање и припрема узорака земљишта за испитивање

1.6.4.1. Прединкубација

Ако су узорци земљишта складиштени (видети одељак 1.6.3.2. ове методе), препоручује се прединкубација у трајању од 2 до 28 дана. Температура и садржај влаге у узорцима у току прединкубације да буду приближни захтевима испитивања (видети одељак 1.6.4.2. и 1.7.1.3. ове методе).

1.6.4.2. Физичка и хемијска својства

Узорци земљишта се ручно чисте од великих предмета (нпр. камење, делови биљака, итд) и мокро просејавају без сувишног сушења на честице величине мање или једнаке од 2 mm. Садржај влаге у узорку земљишта подесити дестилованом или дејонизованом водом на вредност између 40% и 60% максималног капацитета задржавања воде.

1.6.5. Припрема испитиване супстанце за испитивање на узорцима земљишта

Испитивана супстанца се обично примењује уз употребу носача. Носач може бити вода (за супстанце растворљиве у води) или инертни материјал попут финог кварцног песка (величина честица: 0,1 mm до 0,5 mm). Треба избегавати употребу течних носача, осим воде (нпр. органски растварачи као ацетон, хлороформ) с обзиром на то да делују негативно на микрофлору. Уколико се користи песак као носач, може се прекрити са испитиваном супстанцом растворeном или суспендованом у одговарајући растварач. У таквим случајевима, растварач уклонити испаравањем пре мешања са земљиштем. За оптималну дистрибуцију испитиване супстанце у земљишту, препоручује се однос од 10 g песка по килограму земљишта (суве тежине). Контролни узорци се третирају само са еквивалентном количином воде, односно кварцног песка.

Код испитивања испарљивих супстанци избегавати губитке у току испитивања и омогућити њену хомогену расподелу у земљишту (нпр. испитивану супстанцу инјектирати у земљиште на неколико места).

1.6.6. Концентрације испитиване супстанце

Ако се испитују средства за заштиту биља или друге хемикалије са предвидљивим концентрацијама у животној средини користити најмање две концентрације испитиване супстанце. Нижа концентрација одговара најмање максималној количини испитиване супстанце за коју се очекује да ће доспети до земљишта у реалним условима, док је виша концентрација умножак ниже концентрације. Концентрације испитиване супстанце додате узорцима земљишта израчунавају се уз претпоставку да је

она равномерно расподељена до дубине од 5 cm и да је густина земљишта 1,5. За агрохемикалије које се примењују директно на земљиште, или за хемикалије за које се може предвидети количина која доспева до земљишта, препоручене концентрације за испитивање су PEC и концентрације пет пута веће од вредности PEC. Супстанце које ће бити примењене на земљиште више пута у једној сезони испитивати у концентрацијама добијеним множењем вредности PEC са максималним бројем предвиђених примена. Ипак, виша концентрација не сме бити већа од десетоструке вредности највеће примењене концентрације по појединачној примени.

Ако се испитују хемикалије које нису агрохемикалије. Користи се геометријска серија од најмање пет концентрација испитиване супстанце. Концентрације испитиване супстанце покривају опсег потребан за одређивање EC_x вредности.

1.7. ИЗВОЂЕЊЕ ИСПИТИВАЊА

1.7.1. Услови изложености

1.7.1.1. Испитивањалне и контролне групе

Уколико се испитују агрохемикалије, земљишта се дели у три узорка једнаке тежине. Два узорка се мешају са носачем који садржи испитивану супстанцу, а трећи са носачем без испитиване супстанце (контрола). Препоручују се минимално три понављања за сваки узорак, са и без испитиване супстанце. Ако се испитују хемикалије које нису агрохемикалије, земљиште се дели у шест узорака једнаке тежине. Пет узорака се меша са носачем који садржи испитивану супстанцу, а шести са носачем без испитиване супстанце. Препоручају се три понављања по сваком узорку, са и без испитиване супстанце. Треба омогућити хомогену расподелу супстанце у испитиваним узорцима земљишта. Током мешања избегавати пресовање или гњечење земљишта.

1.7.1.2. Инкубација узорака земљишта

Разликују се два начина инкубација узорака земљишта зависно од тога да ли су у питању јединствени узорци сваког испитиваног и сваког контролног узорка земљишта или серије појединачних подузорака једнаке величине за испитиване и за контролне узорке земљишта. У случају испарљивих супстанци испитивање, ипак, извести само са серијама појединачних подузорака. Када се земљиште инкубира као један јединствени узорак, припремају се велике количине земљишта за испитиване и контролне групе и по потреби узимају се подузорци и анализирају. Количина иницијално припремљених узорака за експериментлане и контролне групе зависи од величине подузорака, броја понављања и предвиђеног максималног броја узорковања. Земљишта инкубирана као јединствени узорак добро промешати пре узимања подузорака. Када се узорци инкубирају у серији појединачних подузорака земљишта, основни узорак за испитиване и контролне узорке дели се на тражени број подузорака и они се користе по потреби. У испитивањима где се може очекивати више од два узорковања, обезбедити довољан број подузорака који може да буде довољан за сва понављања и свако узорковање. Треба урадити најмање три понављања по концентрацији испитиване супстанце и инкубирати у аеробним условима (видети одељак 1.7.1.1. ове методе). Током свих испитивања, користити адекватне посуде које онемогућавају развијање анаеробних услова. У случају испарљивих супстанци, испитивање се изводи само са серијом појединачних подузорака.

1.7.1.3. Услови и трајање испитивања

Испитивање се врши у мраку на температури 20° C ± 2° C. Садржај влаге у узорцима земљишта одржавати између 40% и 60% максималног капацитета задржавања воде у земљишту (видети одељак 1.6.4.2. ове методе) са одступањима од ± 5%. По потреби, може се додавати дестилована, дејонизована вода.

Минимално трајање испитивања је 28 дана. Ако се испитују агрохемикалије, пореде се количине насталог угљен-диоксида и утрошеног кисеоника у испитиваним групама у односу на контролу. Ако се 28. дана ове вредности разликују за више од 25% испитивање се наставља док се не постигне разлика ≤ 25% или максимално до 100 дана, зависно који услов се пре испуни. Ако се испитују хемикалије које нису агрохемикалије, испитивање се прекида након 28 дана. Тада се одређују количине насталог угљен-диоксида и утрошеног кисеоника у испитиваним и контролним узорцима земљишта и израчунава EC_x вредност.

1.7.2. Узорковање и анализа земљишта

1.7.2.1. Шема узорковања земљишта

Уколико се испитују агрохемикалије, одређује се брзина глукозом индуковане респирације у узорцима земљишта на почетку испитивања, 7, 14. и 28. дана. Ако је потребно продужити испитивање, обавити додатна мерења сваких 14 дана након 28. дана.

Ако се испитују супстанце које нису агрохемикалије, испитује се најмање пет концентрација испитиване супстанце и одређује се брзина глукозом индуковане брзине респирације у узорцима земљишта на почетку (дан 0) и на крају периода излагања (28. дан). Уколико се покаже потребним додатно мерење се може обавити средином тог периода, нпр. седмог дана. Подаци добијени 28. дана користе се у одређивању EC_x вредности за дату хемикалију. Подаци добијени из контролних узорака на почетку испитивања могу користити у одређивању иницијалних количина метаболички активне микробиолошке биомасе у земљишту[12].

1.7.2.2. Мерење глукозом индуковане брзине респирације

Глукозом индукована брзина респирације у сваком понављању за узорке земљишта испитиване и контролне групе одређује се при сваком времену узорковања. Узорци земљишта се мешају са довољном количином глукозе да се изазове максимални респираторни одговор. Количина глукозе потребна за изазивање максималног респираторног одговора за дато земљиште може се одредити у прелиминарном испитивању испитујући серију концентрација глукозе[14]. За песковита земљишта

са садржајем органског угљеника 0,5% до 1,5%, обично је довољно 2.000 mg до 4.000 mg глукозе по килограму суве тежине земљишта. Глукоза се може самлети у прах са чистим кварцним песком (10 g песка/kg суве тежине земљишта) и хомогенизовати са земљиштем.

Узорци земљишта обогаћени глукозом инкубирају се у одговарајућој посуди за мерење брзине респирације у континуитету, или на сваки сат, или на свака два сата (видети одељак 1.6.1. ове методе), на температури 20° C ± 2° C. Количина ослобођеног угљен-диоксида и утрошеног кисеоника мери се наредних 12 сати, а мерење почети што је пре могуће, пожељно 1 до 2 сата након додавања глукозе. Укупна количине ослобођеног угљен-диоксида или утрошеног кисеоника у току 12 сати мери се и одређује средња брзина респирације.

2. ПОДАЦИ

2.1. ОБРАДА РЕЗУЛТАТА

Уколико се испитују агрохемикалије, забележити количину насталог угљен-диоксида или утрошеног кисеоника за све узорке испитиване групе, а средње вредности за сва понављања навести у табеларној форми. Резултате проценити одговарајућим и опште прихваћеним статистичким методама (нпр. F-тест, ниво значаја 5%). Брзина глукозом индуковане респирације се изражава у mg угљен-диоксида/kg суве тежине земљишта/x или mg кисеоника/суве тежине/x. Средња вредност брзине настајања угљен-диоксида или средња вредност брзине потрошње кисеоника у свакој испитиваној групи пореди се са контролном групом и рачуна се проценат одступања од вредности у контроли.

Ако се испитују супстанце које нису агрохемикалије, одређују се количине ослобођеног угљен-диоксида или утрошеног кисеоника за сваки узорак испитиване групе и прави се крива дозне зависности за процену EC_x вредности. Брзина глукозом индуковане респирације (нпр. mg CO_2/kg суве тежине земљишта/h или mg кисеоника/суве тежине земљишта/h) у испитиваним узорцима након 28 дана пореди се са вредностима у контроли. Из тих података рачуна се проценат вредности инхибиције за сваку концентрацију испитиване супстанце. Ови резултати приказују се графички у функцији концентрација испитиване супстанце, а за одређивање EC_x вредности користе се статистичке процедуре. Интервали поверења (p = 0,95) за израчунате EC_x вредности и путем стандардних процедура[15, 16, 17].

2.2. ТУМАЧЕЊЕ РЕЗУЛТАТА

Када се процењују резултати испитивања са агрохемикалијама и кад је разлика у брзини респирације између прве испитиване групе у серији (максимална предвиђена концентрација) и контроле ≤ 25% у било ком времену узорковања након 28. дана, за дате хемикалије се може оценити да немају дугорочни утицај на трансформацију угљеника у земљишту. Када се процењују резултати добијени испитивањем супстанци које нису агрохемикалије, користе се EC_{50}, EC_{25}, односно EC_{10} вредности.

3. ИЗВЕШТАЈ

Извештај о испитивању садржи:

1) потпуну идентификацију коришћеног земљишта, укључујући:

– географске одреднице места (географска ширина и дужина);

– податке о историји места (нпр. биљни покривач, третмани средствима за заштиту биља, третмани ђубривима, контаминације услед несрећног случаја итд);

– употреба земљишта (нпр. пољопривредно земљиште, шума итд);

– дубина узорковања (cm);

– садржај песка/муља/глине (% суве тежине);

– pH вредност (у води);

– садржај органског угљеника (% суве тежине);

– садржај азота (% суве тежине);

– јонско изменивачки капацитет (mmol/kg);

– почетна биомаса микроорганизама у процентима у односу на укупан органски угљеник;

– литература везано за све методе коришћене за одређивање сваког параметра;

– сви подаци у вези са сакупљањем и складиштењем узорака земљишта;

– детаљи о прединкубацији, ако постоје;

2) податке о испитиваној супстанци:

– физичка својства и где је битно, физичка и хемијска својства;

– подаци за идентификацију хемикалије, укључујући структурну формулу и степен чистоће (нпр. за средства за заштиту биља, проценат активног састојка), садржај азота.

3) податке о условима испитивања:

– опис обогаћивања земљишта органским супстратом;

– број концентрација испитиване супстанце и где је прикладно, објашњење за избор датих концентрација;

– опис начина увођења испитиване супстанце у земљиште;

– температура инкубације;

– садржај влаге у земљишту на почетку и у току испитивања;

– коришћена метода инкубације земљишта (јединствен узорак или серија појединачних подузорака);

– број понављања;

– број узорковања;

4) податке о резултатима:

– метода и опрема за мерење брзине респирације;

– табеларни подаци укључујући појединачне и средње вредности за количину угљен-диоксида или кисеоника;

– варијанса у контролним и експерименталним групама;

– објашњење корекција у израчунавању, уколико је битно;

– проценат разлике глукозом индуковане брзине респирације при сваком времену узорковања, или, уколико је прикладно EC_{50} са 95% интервалима поверања, друге EC_x вредности (нпр. EC_{25} или EC_{10}) са интервалима поверења и графички приказ криве дозне зависности;

– статистичка обрада резултата, где је прикладно;

– све додатне податке и опажања потребне за за тумачење резултата.

4. ЛИТЕРАТУРА

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. SETAC-Europe, (1995) Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides, Ed. M.R. Lynch, Pub. SETAC-Europe, Brussels.

5. OECD, (1995) Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italy, 18-20 January 1995.

6. ISO 10381-6, (1993) Soil quality – Sampling. Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.

7. Anderson, J.P.E., (1987) Handling and Storage of Soils for Pesticide Experiments, in 'Pesticide Effects on Soil Microflora'. Eds. L. Somerville and M.P. Greaves, Chap. 3: 45-60.

8. Anderson, J.P.E., (1982) Soil Respiration, in 'Methods of Soil Analysis – Part 2: Chemical and Microbiological Properties'. Agronomy Monograph No 9. Eds. A.L. Page, R.H. Miller and D.R. Keeney. 41: 831- 871.

9. ISO 11266-1, (1993) Soil Quality – Guidance on Laboratory Tests for Biodegradation in Soil: Part 1. Aerobic Conditions.

10. ISO 14239, (1997E) Soil Quality – Laboratory incubation systems for measuring the mineralisation 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: Substrateinduced respiration method.

13. ISO 14240-2, (1997) Soil quality – Determination of soil microbial biomass – Part 2: Fumigationextraction 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. АЕРОБНА И АНАЕРОБНА ТРАНСФОРМАЦИЈА У ЗЕМЉИШТУ

Део први

1. МЕТОДА ИСПИТИВАЊА

Метода се заснива на Упутству за испитивање OECD 307 (2002).

1.1. УВОД

Ова метода базира се на постојећим смерницама[1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9]. Описана метода осмишљена је за процену аеробне и анаеробне трансформације хемикалија у земљишту. Испитивања се обављају да би се утврдила: 1. брзина трансформације испитиване супстанце и 2. природа и брзина стварања и разлагања производа транформације којима би биљке и земљишни организми могли бити изложени. Оваква испитивања су потребна за хемикалије које се примењују директно на земљиште или које доспевају у земљиште. Резултати таквих лабораторијских испитивања могу се користити и при развијању протокола узимања узорака и анализе за сродна истраживања у овом подручју.

Аеробне и анаеробне студије са једним типом земљишта обично су довољне за процену путева трансформације[8, 10, 11]. Брзина трансформације одређује се у најмање три додатна типа земљишта[8, 10].

На OECD радионици о избору земљишта и седимента[10] договорен је број и тип земљишта која се користе у овој методи испитивања. Типови испитиваних земљишта представљају услове у животној средини где ће се хемикалије употребљавати или испустити. На пример, хемикалије које би се могле испуштати у суптропским и тропским климатима испитивати на ферасолу и нитосолу (FAO систем). Дате су и препоруке у вези сакупљања, руковања и складиштења узорака земљишта, према ISO стандарду[15]. Употреба пиринчаних поља се подједнако узима у обзир у овој методи.

1.2. ДЕФИНИЦИЈЕ

Испитивана супстанца јесте било која супстанца, изворна супстанца или производи трансформације.

Производи трансформација јесу све супстанце које су резултат биотичких и абиотичких реакција трансформација испитиване супстанце, укључујући CO_2 и везане резидуе.

Везане резидуе јесу једињења у земљишту, биљкама или животињама које се задржавају у матриксу у облику изворне супстанце или њених метаболита/производа трансформације после екстракције. Метода екстракције не сме битно мењати супстанце или структуру матрикса. Природа везе се може делимично објаснити методама екстракције које мењају матрикс и софистицираним аналитичким техникама. На овај начин су до данас идентифиовани ковалентна јонска и сорптивна веза и молекулске замке. Везивање резидуа знатно смањује биодоступност и биорасположивост[12] (измењен IUPAC 1984 извештај[13]).

Аеробна трансформације јесу реакције које се одвијају у присуству молекулског кисеоника[14].

Анаеробна трансформације јесу реакције које се одвијају без присуства молекулског кисеоника[14].

Земљиште јесте мешавина минералних и органских хемијских састојака које чине једињења са високим процентом угљеника и азота, као и једињења великих молекулских маса, у којима углавном живе микроорганизми. Земљиште може бити у једном од два стања:

– непоремећено, како се временом развило, у карактеристичним хоризонтима и разним типовима земљишта;

– поремећено, какво се обично налази на ораницама, или какво се јавља у узорцима који се ископају и користе у овој методи испитивања[14].

Минерализација јесте потпуно разлагање органске материје на CO_2 и H_2O у аеробним условима и до CH_4, CO_2 и H_2O у анаеробним условима. У овој методи кад се користи једињење обележено угљеником C^{14}, минерализација јесте екстензивно разлагање у току којег означени угљеников атом оксидује уз отпуштање одређене количине $C^{14}O_2$[14].

Полуживот ($t_{0,5}$) јесте време потребно за трансформацију 50% испитиване супстанце, у случајевима када се трансформација може описати кинетиком првог реда и не зависи од почетне концентрације.

Време нестајања 50 (у даљем тексту: DT_{50}) јесте време у току кога се почетна концентрација испитиване супстанце смањи за 50%, разликује се од полуживота $t_{0,5}$ када трансформација не следи кинетику првог реда.

Време нестајања 75 (у даљем тексту DT_{75}) јесте време у току кога се почетна концентрација испитиване супстанце смањи за 75%.

Време нестајања 90 (у даљем тексту: DT_{90}) јесте време у току кога се почетна концентрација испитиване супстанце смањи за 90%.

1.3. РЕФЕРЕНТНЕ СУПСТАНЦЕ

Референтне супстанце се користе за идентификацију и квантификацију производа трансформације спектроскопским и хроматографским методама.

1.4. ПРИМЕНЉИВОСТ МЕТОДЕ

Метода је примењива на супстанце (необележене или обележене) за које је доступна довољно прецизна и осетљива аналитичка метода. Примењива је на слабо испарљива једињења, неиспарљива једињења, једињења растворљива у води или једињења нерастворљива у води. Метода испитивања се не примењује на једињења која су јако испарљива из земљишта (нпр. фумиганти, органски растварачи) и зато се не могу држати у земљишту у испитиваним условима ове методе.

1.5. ПОДАЦИ О ИСПИТИВАНОЈ СУПСТАНЦИ

Необележене или обележене супстанце могу се користити за мерење брзине трансформације. За проучавање путева трансформације и одређивања масеног баланса потребан је обележени материјал. Обележавање угљеником C^{14} се препоручује, али употреба других изотопа као што су C_{13}, N_{15}, H_3, P_{32} такође може бити од користи. Молекул означити у што је могуће стабилнијем делу. Чистоћа испитиване супстанце је најмање 95%.

Пре испитивања аеробне и анаеробне трансформације у земљишту, о испитиваној супстанци су доступни подаци:

– растворљивост у води (Метода А.6. која је дата у овом правилнику);

– растворљивост у органским растварачима;

– напон пара (Метода А.4. која је дата у овом правилнику) и Хенријева константа;

– коефицијент расподеле у систему *п*-октанол/вода (Метода А.8. која је дата у овом правилнику);

– хемијска стабилност у мраку (хидролиза) (Метода С.7. која је дата у овом прилогу);

– pK_a, ако је молекул склон протонацији и депротонацији (OECD смернице 112)[16].

Остали корисни подаци могу укључивати податке о токсичности испитиване супстанце за земљишне микроорганизме (Методе С.21. и С.22. које су дате у овом прилогу)[16].

Аналитичке методе (укључујући методе екстракције и чишћења) за идентификацију и квантификацију испитиване супстанце и њених производа трансформације треба да буду доступне.

1.6. ПРИНЦИП МЕТОДЕ

Узорци земљишта третирају се испитиваном супстанцом и инкубирају у мраку у боцама типа биометра или у проточним системима у контролисаним лабораторијским условима (при константној температури и влажности земљишта). Након предвиђених временских интервала, узорци земљишта се екстрахују и анализирају на изворне супстанце и производе трансформације. Испарљиви производи се такође скупљају за анализу користећи потребне уређаје за адсорпцију. Користећи материјал обележен са C^{14}, могу се измерити разне брзине минерализације испитиване супстанце, хватањем $C^{14}O_2$ који се развио масеним балансом, укључујући стварање везних резидуа земљишта.

1.7. КРИТЕРИЈУМИ КВАЛИТЕТА

1.7.1. Ефикасност аналитичке технике

Екстракција и анализа најмање два узорка земљишта непосредно након додавања испитиване супстанце даје прву назнаку о поновљивости аналитичке методе и уједначености поступка примене за испитивану супстанцу. Ефикасност аналитичке технике у каснијим фазама испитивања одређује се из масених баланса. Ефикасност аналитичке технике је у опсегу од 90% до 110% за обележене хемикалије[8] и од 70% до 110% за необележене хемикалије[3].

1.7.2. Поновљивост и осетљивост аналитичке методе

Поновљивост аналитичке методе (искључујући почетну ефикасност екстракције) у квантификовању испитиване супстанце и производа трансформације може се проверити анализама истог екстракта земљишта у дупликату, инкубираног довољно дуго да би се створили производи трансформације.

Граница детекције (Limit of Detection, у даљем тексту: LOD) аналитичке методе за испитивану супстанцу и за производе трансформације је најмање 0,01 mg/kg земљишта (као испитивана супстанца) или 1% примењене дозе, која доза је нижа. Граница квантификације (Limit of Quantification, у даљем тексту: LOQ) такође треба да буде одређена.

1.7.3. Прецизност података о трансформацији

Регресиона анализа концентрација испитиване супстанце у функцији времена даје адекватне податке о поузданости трансформационе криве и омогућава израчунавање интервала поверења за полуживот (ако је примењива кинетика псеудо првог реда), или DT_{50} вредности и ако су примењиве, DT_{75} и DT_{90} вредности.

1.8. ОПИС МЕТОДЕ

1.8.1. Опрема и хемијски реагенси

Инкубациони системи се састоје од статичких затворених система или адекватних проточних система[7, 17]. Примери одговарајућих апарата за проточну инкубацију и боца типа биометара приказани су на сликама 1 и 2. Оба типа

инкубационих система имају предности и ограничења[7, 17].

Потребна је стандардна лабораторијска опрема, а посебно:

– аналитички инструменти као што су GLC, HPLC, TLC, укључујући одговарајуће системе за детекцију и за анализу радиоизотопима обележених, или необележених супстанци, или опрема за методу инверзног разређења изотопа;

– инструменти за идентификацију (MS, GC-MS, HPLC-MS, NMR, итд);

– течни сцинтилациони бројач;

– оксидатор за спаљивање радиоактивног материјала;

– центрифуга;

– апаратура за екстракцију (на пример, кивете за центрифугу код хладне ектракције и Soxhlet апаратура за континуирану екстракцију под рефлуксом);

– инструменти за концентровање раствора и екстракта (нпр. ротирајући испаривач);

– водено купатило;

– механичка мешалица (нпр. машина за мешање, ротирајући миксер).

Хемијски реагенси који се користе укључују на пример:

– NaOH, аналитичке чистоће, 2 mol/dm^3, или друге адекватне базе (нпр. KOH, етаноламин);

– H_2SO_4, аналитичке чистоће, 0,05 mol/dm^3;

– етиленгликол, аналитичке чистоће;

– чврсти материјали за апсорпцију као што су кречњак и полиуретански чепови;

– органски растварачи, аналитичке чистоће, као што су ацетон, метанол итд.;

– сцинтилационе течности.

1.8.2. Наношење испитиване супстанце

За додавање и расподелу у земљишту, испитивана супстанца се може растворити у води (дејонизованој или дестилованој), или када је потребно, у минималним количинама ацетона или другог органског растварача[6] у коме је испитивана супстанца довољно растворљива и стабилна. Количина изабраног растварача не сме битније да утиче на микробиолошку активност земљишта (видети одељке 1.5. и 1.9.2. до 1.9.3. ове методе). Употребу растварача који спречавају микробиолошку активност земљишта, као што су хлороформ, дихлорметан и остали халогени растварачи, избегавати.

Испитивана супстанца се може додати и као чврста супстанца, нпр. мешана са кварцним песком[6] или у малим подузорцима испитиваног земљишта који су осушени на ваздуху и стерилисани. Ако се испитивана супстанца додаје са растварачем, растварач упарити пре него што се подузорак дода оригиналном нестерилном узорку земљишта.

У случају хемикалија, чији је главни пут уноса у земљиште канализациони муљ, или њихова употреба у пољопривреди, испитивану супстанцу прво додати у муљ, који се потом уводи у узорак земљишта (видети одељке 1.9.2. и 1.9.3. ове методе).

Не препоручује се рутинска употреба формулисаних производа. За слабо растворљиве супстанце, употреба формулисаног материјала може бити примерена алтернатива.

1.8.3. Земљишта

1.8.3.1. Избор земљишта

За одређивање пута трансформације може се користити репрезентативно земљиште: песковита иловача, муљевита иловача, иловача или песак са иловачом (по FAO и USDA класификацији[18]) са pH од 5,5 до 8,0. Препоручује се удео органског угљеника од 0,5% до 2,5% и микробиолошке биомасе од најмање 1% од укупног органског угљеника[10].

За испитивање брзине трансформације користити најмање три додатна типа земљишта који представљају опсег релевантних типова. Земљишта треба да варирају у уделу органског угљеника, pH вредности, уделу глине и микробиолошке биомасе[10].

Све врсте земљишта окарактерисати барем по текстури (% песка, % муља, % глине, по FAO и USDA класификацији[18]), pH вредности, катјонском измењивачком капацитету, садржају органског угљеника, густини, капацитету задржавања[XXXV] воде и микробиолошке биомасе (само за аеробна испитивања). Додатни подаци о карактеристикама земљишта могу бити корисни код тумачења резултата. За одређивање карактеристика земљишта могу се користити методе наведене у литератури[19, 20, 21, 22, 23]. Микробиолошку биомасу одредити користећи методу[25, 26] супстрат – индукованог дисања (SIR) или алтернативним методама[20].

_____

XXXV Капацитет задржавања воде у земљишту се може мерити као пољски капацитет влажности, као капацитет задржавања воде или јачина упијања воде (pF). За објашњења видети Део други ове методе. У извештају навести ако су карактеристике ретенције воде и густоћа масе земљишта одређени у непоремећеним или поремећеним (обрађеним) узорцима.

1.8.3.2. Сакупљање, руковање и складиштење земљишта

Треба располагати детаљним подацима о историјату локације на терену одакле се скупљају узорци испитиваног земљишта. Детаљи укључују тачну локацију, биљни покривач, третирање хемикалијама, третман са органским и минералним ђубривима, додатак биолошких материјала или друге контаминације. Земљишта третирана са испитиваном супстанцом или њеним структурним аналозима, у претходне четири године не смеју се користити у испитивању трансформације[10, 15].

Земљиште за испитивање је свеже скупљено са поља (од хоризонта А или 20 cm површинског слоја) са садржајем воде које олакшава просејавање. За сва земљишта осим оних са пиринчаних поља, узорке не би требало узимати у току или одмах након дугих периода (> 30 дана) суше, смрзавања или плављења[14]. Узорци се транспортују на начин који минимализује промене у садржају воде у земљишту и држе се у мраку, у присуству ваздуха, колико год је могуће. Лабаво везана полиетиленска врећа је обично добра за ову сврху.

Земљиште обрадити што је раније могуће након узимања узорака. Вегетацију, већу фауну земљишта и камење уклонити пре просејавања земљишта кроз сито промера 2 mm које уклања мање камење, фауну и остатке биља. Треба избегавати јаче сушење и дробљење земљишта пре просејавања[15].

Кад је узимање узорака отежано, зими у пољу (земљиште је замрзнуто или прекривено слојевима снега), узорак се може узети са гомиле земљишта ускладиштеног у стакленику под биљним покривачем (нпр. трава или мешано трава – детелина). За испитивања се строго препоручује употреба узорака земљишта који су непосредно сакупљени са поља, али ако се обрађено и процесирано земљиште складишти пре почетка испитивања, потребно је да услови складиштења бити адекватни и само на ограничено време (температура од 4° C ± 2° C, на максимално 3 месеца) да би се одржала микробиолошка активност[XXXVI]. Детаљнија упутства о сакупљању, руковању и складиштењу земљишта која се користе у методи испитивања трансформације дата су у литератури[8, 10, 15, 26, 27].

Пре испитивања земљиште прединкубирати да би се допустило клијање и уклањање семена како би се поновно успоставила равнотежа микробиолошког метаболизма, пратећи промене од узорковања, или услова складиштења до услова инкубације. Прединкубациони период између 2 и 28 дана у току кога се апроксимирају услови температуре и влаге конкретне методе испитивања је опште прихваћен[15]. Време складиштења и прединкубације заједно не траје дуже од три месеца.

_____

XXXVI Резултати недавних истраживања указују да се земљишта из умерених зона могу складиштити на температури -20 °C, више од три месеца[28, 29], без значајног губитка микробиолошке активности.

1.9. ТОК ИСПИТИВАЊА

1.9.1. Услови у току испитивања

1.9.1.1. Температура

Током читавог испитивања, узорке земљишта инкубирати у мраку на константној температури репрезентативној за услове климе где ће се испитивана супстанца употребљавати или испуштати. Температура од 20° C ± 2° C препоручује се за све испитиване супстанце које могу допрети до земљишта у умереној клими. Температура се прати.

За хемикалије које се примењују или испуштају у хладнијој клими (рецимо у северним земљама, у току јесени/зиме) инкубирати додатне узорке земљишта, али на нижој температури (10° C ± 2° C).

1.9.1.2. Садржај влаге

За испитивање трансформације у аеробним условима, садржај влаге у земљишту[XXXVII] прилагодити и одржати на pF између 2,0 и 2,5[3]. Садржај влаге у земљишту се изражава као маса воде по маси сувог земљишта и редовно се контролише (нпр. у интервалима од 2 недеље) мерењем боца за инкубацију, а губитак воде надокнадити њеним додавањем (најбоље стерилном, филтрираном водоводном водом). Треба пазити да се при додавању воде спрече или минимализују губици испитиване супстанце, односно производа трансформације испаравањем и/или фотодеградацијом (ако се деси).

За испитивање трансформације у анаеробним условима и условима пиринчаних поља, земљиште да буде сатурисано водом, плављењем.

_____

XXXVII Земљиште да буде ни превише влажно ни превише суво да би се одржала адекватна аерација и исхрана земљишне микрофлоре. Садржај влаге за оптимални микробиолошки раст је у распону од 40% до 60% капацитета задржавања воде (water holding capacity, WHC) и од 0,1 бара до 0,33 бара. Тај распон је еквивалентан распону pF од 2,0 до 2,5 јединица. Типичан садржај влаге разних типова земљишта дат је у Делу трећем ове методе.

1.9.1.3. Аеробни услови инкубације

У проточним системима, аеробни услови се одржавају испрекиданим испирањем или континуираним проветравањем влажним ваздухом. У боцама типа биометра, размена ваздуха се постиже дифузијом.

1.9.1.4. Стерилни аеробни услови

Да би се добили подаци о значају абиотичке трансформације испитиване супстанце, узорци земљишта се могу стерилисати (за методе стерилизације видети у литератури[16, 29]), третирани стерилном испитиваном супстанцом (нпр. додавање раствора кроз стерилни филтар) и проветравати овлаженим, стерилним ваздухом како је описано у одељку 1.9.1.3. ове методе. За земљишта са пиринчаних поља, вода и земљиште да буду стерилисани, а инкубација се обавља како је описано у одељку 1.9.1.6. ове методе.

1.9.1.5. Анаеробни услови инкубације

Да би се успоставили и одржали анаеробни услови, земљиште које је третирано са испитиваном супстанцом и инкубирано у аеробним условима 30 дана или у току полуживота или DT_{50} (у зависности од тога које је време краће) ставља се у воду (1 cm до 3 cm слоја воде) и инкубациони систем се испере инертним гасом (нпр. азотом или аргоном)[XXXVIII]. Испитивани систем омогућава мерења попут pH вредности, концентрације кисеоника и редокс потенцијала и садржи апаратуру за хватање испарљивих производа. Систем типа биометра је затворен да се избегне улазак ваздуха дифузијом.

_____

XXXVIII Аеробни услови су доминантни у површинском и чак у под-површинском земљишту, као што је видљиво из истраживачког пројекта спонзорисаног од ЕУ [K. Takagi et al. (1992). Microbial diversity and activity in subsoils: Methods, field site, seasonal variation in subsoil temperatures and oxygen contents. Proc. Internat. Symp. Environm. Aspects Pesticides Microbiol., 270-277, 17-21 August 1992, Sigtuna, Sweden]. Анаеробни услови се могу појавити само повремено, током поплава након јаких киша, или кад се успостављају услови посебног наводњавања у пиринчаним пољима.

1.9.1.6. Услови инкубације за земљишта са пиринчаних поља

Да би се испитала трансформација у земљиштима пиринчаних поља, земљиште се плави слојем воде од око 1 cm до 5 cm и испитивана супстанца се додаје у водену фазу[9]. Препоручује се дубина земљишта од најмање 5 cm. Систем се аерише у аеробним условима. Вредност pH, концентрацију кисеоника и редокс потенцијал воденог слоја пратити и навести. Потребан је прединкубациони период од најмање две недеље пре почетка испитивања трансформације (видети одељак 1.8.3.2. ове методе).

1.9.1.7. Дужина испитивања

Испитивања брзине и путева не треба да буду дужа од 120 дана[XXXIX, 3, 6, 8], јер би се након тога, временом, очекивало смањење микробиолошке активности, у вештачком лабораторијском систему, изолованом од природног надопуњавања. Испитивања се могу продужити на дуже периоде тамо где је потребно окарактерисати смањење испитиване супстанце и стварање и разлагање главних производа трансформације. (нпр. 6 или 12 месеци)[8]. Дуже периоде инкубације образложити у извештају о испитивању уз пропратна мерења биомасе у току и на крају ових периода.

_____

XXXIX Аеробна испитивања се могу прекинути много пре 120 дана ако се за то време утврде коначни пут трансформације и постигне потпуна минерализација. Прекид испитивања је могућ после 120 дана, или када се барем 90% испитиване супстанце трансформише, али само ако се формира најмање 5% CO_2.

1.9.2. Ток испитивања

Отприлике 50 g до 200 g земљишта (суве масе) ставља се у сваку инкубациону боцу (видети Слику 1 и 2 у Делу трећем ове методе) и земљиште се третира испитиваном супстанцом, коришћењем неке од метода описаних у одељку 1.8.2. ове методе. Ако се користе органски растварачи за наношење испитиване супстанце, они се уклоне из земљишта испаравањем. Земљиште се добро промеша спатулом, односно боца се протресе. Ако се испитивање изводи у условима пиринчаних поља, земљиште добро промешати са водом након примене испитиване супстанце. Мање узорке (нпр. од 1 g) третираног земљишта анализирати на испитивану супстанцу да би се проверила равномерност расподеле.

Испитивана доза да буде усаглашена са највишом примењеном дозом средства за заштиту биља препорученом у упутству за употребу и равномерне примене на одговарајућим дубинама у пољу (у горњих 10 cm слоја[XL] земљишта). На пример, за хемикалије које се примењују на лишће или земљиште, али без инкорпорације, 2,5 cm је прикладна дубина за израчунавање колико хемикалије додати у сваку боцу. За хемикалије унете у земљиште, прикладна дубина је она наведена у упутствима за употребу. Уопштено, за хемикалије брзина примене се процењује према најзначајнијем путу уласка. На пример, кад је главни пут уласка преко канализационог муља, хемикалију дозирати у муљ, у концентрацији која одражава очекивану концентрацију муља, а количина додатог муља одражава уобичајени муљ који се додаје пољопривредним земљиштима. Ако ова концентрација није довољно висока да омогући идентификацију главних производа трансформације, могла би помоћи инкубација одвојених узорака земљишта који садрже већи опсег, али избегавати превелике количине које утичу на микробиолошке функције земљишта (видети одељке 1.5. и 1.8.2. ове методе).

_____

XL Израчунавање почетне концентрације на бази површине дато је једначином:

$$C_{земљишта}[mg/kg_{земљишта}] = \frac{A[kg/ha] \times 10^6 [mg/kg]}{l[m] \times 10^4 [m^2/ha] \times d\,[kg_{земљишта}/m^3]}$$

При чему:

$C_{земљишта}$ јесте почетна концентрација у земљишту (mg/kg);

A јесте доза за примену (mg/kg);

l јесте дебљина земљишног слоја у пољу [m]; d = густина суве земљишне масе (kg/m^3).

Апроксимативно, доза примене од 1 kg/ha јесте приближно 1 mg/kg земљишне концентрације у слоју од 10 cm (претпостављајући густину масе од 1 g/cm^3).

Већи комад земљишта (нпр. 1 kg до 2 kg) може се третирати испитиваном супстанцом, пажљиво помешати у одговарајућој мешалици и поделити у мање порције од 50 g до 200 g у боце за инкубацију (коришћењем разводника). Мање аликвоте (нпр. 1 g) третираног земљишта анализирати на испитивану супстанцу да би се проверила равномерност расподеле. Таква процедура има предности јер допушта равномернију расподелу испитиване супстанце у земљишту.

Необрађени узорци се такође инкубирају у истим условима (аеробним) као и узорци третирани испитиваном супстанцом. Ти узорци се користе за мерење биомасе у току и на крају испитивања.

Када се испитивана супстанца примењује на земљиште растворена у органским растварачима, узорци земљишта третирани истом количином растварача инкубирају се у истим условима (аеробним), као и узорци третирани испитиваном супстанцом. Ови узорци се користе за мерење биомасе у почетку, у току и на крају испитивања, да би се проверили ефекти растварача на микробиолошку биомасу.

Боце које садрже третирано земљиште се или спајају на проточне системе описане на Слици 1, или се затварају апсорпционом колоном приказаном на Слици 2 (видети Део четврти ове методе).

1.9.3. Узимање узорака и мерење

Дупле боце за инкубацију уклањају се у одговарајућим временским интервалима и узорци земљишта екстрахују одговарајућим растварачима различите поларности и анализирају на испитивану супстанцу, односно производе трансформације. Добро осмишљено испитивање укључује довољно боца тако да се две боце могу одбацити при сваком узимању узорака. Раствори за апсорпцију или крути материјали за апсорпцију уклањају се у различитим временским интервалима (7-дневни интервали у току првог месеца и 17-дневни интервали након првог месеца), у току и на крају инкубације сваког узорка земљишта и анализирају на испарљиве продукте. Осим узорка земљишта узетог непосредно након примене (узорак, нултог дана) укључити најмање 5 додатних тачака узорковања. Временске интервале изабрати тако да се образац опадања испитиване супстанце и обрасци стварања и разлагања продуката трансформације могу успоставити (нпр. 0, 1, 3, 7. дан; 2, 3. недеља; 1, 2, 3. месец, итд).

Када се користи испитивана супстанца означена угљеником C^{14}, радиоактивност која се не може екстраховати квантификоваће се спаљивањем, а масени баланс ће се израчунати за сваки интервал узорковања.

У случају анаеробне инкубације и инкубације наводњаваних узорака, фаза земљишта и воде заједно се анализирају на испитивану супстанцу и производе трансформације, или се одвајају филтрацијом, или центрифугом пре екстракције и анализе.

1.9.4. Факултативна испитивања

Аеробна, нестерилна испитивања на додатним температурама могу бити корисне за процену утицаја температуре и влаге у земљишту на брзину трансформације испитиване супстанце, односно њених производа трансформације у земљишту.

Додатна карактеризација радиоактивности која се не може екстраховати може се покушати употребом, на пример суперкритичне течне екстракције.

2. ПОДАЦИ

2.1. ОБРАДА РЕЗУЛТАТА

Количине испитиване супстанце, производа трансформације, испарљивих супстанци (само у процентима) и супстанци које се не могу екстраховати изражавају се у проценту примењене почетне концентрације и где је прикладно, као mg/kg земљишта (на бази суве масе земљишта) за сваки интервал узорковања. Масени баланс се изражава као проценат примењене почетне концентрације за сваки интервал узорковања. Графички приказ концентрација супстанце у функцији времена омогућиће процену полуживота или DT_{50}. Главни производи трансформације идентификују се и њихове концентрације се такође приказују у функцији времена, да би се показала брзина њиховог настанка и распада. Главни производ трансформације је било који производ који представља ≥ 10% примењене дозе, у било које време у току испитивања.

Испарљиви производи који се ухвате дају назнаку потенцијала испарљивости испитиване супстанце и њених производа трансформације из земљишта.

Прецизнија одређивања полуживота или DT_{50} вредности и ако је прикладно, DT_{75} и DT_{90} вредности постижу се применом

одговарајућих калкулација помоћу кинетичких модела. Полуживот или DT_{50} вредности наводе се у извештају заједно са описом модела који је коришћен, као и редом кинетике и коефицијентом одређивања (r^2). Пожељнија је кинетика првог реда, осим ако је $r^2 < 0,7$. Ако је прикладно, калкулације се такође примењују на главне производе трансформације. Примери прикладних модела дати су у литератури[31-35].

У случају испитивања брзина на различитим температурама, брзине трансформације описане су Аренијусовом једначином, као функција температуре унутар опсега испитиване температуре:

$$k = A \times e^{-B/T}$$

или

$$\ln k = \ln A - \frac{B}{T}$$

при чему:

ln A и B јесу константе регресије из прекида и нагиба, најбоље апроксимираног правца генерисаног линеарном регресијом ln k према 1/T;

k јесте константа брзине на температури T;

T јесте температура у келвинима (K).

Треба пазити на ограничени опсег температура за које ће Аренијусова релација бити важећа у случају да је трансформација диригована микробиолошком активношћу.

2.2. ПРОЦЕНА И ТУМАЧЕЊЕ РЕЗУЛТАТА

Иако се испитивања изводе у вештачким лабораторијским условима, резултати омогућавају процену брзине трансформације испитиване супстанце, као и брзину стварања и распада производа трансформације у теренским условима[36, 37].

Студија путева трансформације испитиване супстанце даје податке о начину на који се примењена супстанца структурно мења у земљишту хемијским и микробиолошким реакцијама.

3. ИЗВЕШТАЈ

ИЗВЕШТАЈ О ИСПИТИВАЊУ

Извештај о испитивању садржи податке о:

1) испитиваној супстанци:

– име, хемијски назив, CAS број, структурна формула (назначујући место обележавања, кад се користи материјал означен радиоизотопима) и одговарајућа физичка и хемијска својства (видети одељак 1.5. ове методе);

– чистоћа (нечистоће) испитиване супстанце;

– радиохемијска чистоћа обележене хемикалије и специфична активност (где је прикладно);

2) референтним супстанцама:

– хемијски назив и структура референтних супстанци које се користе за карактеризацију, односно идентификацију производа трансформације;

3) испитиваном земљишту:

– детаљи о месту сакупљања;

– датум и процедура узимања узорака земљишта;

– својства земљишта, као што су pH вредност, садржај органског угљеника, текстура (% песка, % муља, % глине), катјонски измењивачки капацитет, густоћа масе, својства задржавања воде и микробиолошка биомаса;

– дужина складиштења земљишта и услови складиштења (ако је складиштено);

4) условима у току испитивања:

– датуми испитивања;

– количина примењене испитиване супстанце;

– употребљени растварачи и метода њихове примене на испитивану супстанцу;

– маса земљишта третираног у почетку и узоркованог у сваком интервалу за анализу;

– опис коришћеног система за инкубацију;

– протоци ваздуха (само за проточне системе);

– температуре у испитиваном систему;

– садржај влаге у земљишту у току инкубације;

– микробиолошка биомаса у почетку, у току и на крају аеробних студија;

– pH, концентрација кисеоника и редокс потенцијал у почетку, у току и на крају анаеробних и студија пиринчаних поља;

– методе екстракције;

– методе за квантификацију и идентификацију испитиване супстанце и главних производа трансформације у земљишту и апсорпционим материјалима;

– број реплика и број контрола.

5) резултатима:

– резултат одређивања микробиолошке активности;

– поновљивост и осетљивост коришћених аналитичких метода;

– ефикасност примењене аналитичке технике (проценат вредности за прихватљиву студију су дате у одељку 1.7.1. ове методе);

– табела резултата изражена у процентима примењене почетне дозе и где је прикладно, у mg/kg тла (на бази суве масе);

– масени баланс у току и на крају студије;

– карактеризација радиоактивности која се не може екстраховати (везана) или резидуа у земљишту;

– квантификација испуштеног CO_2 и осталих испарљивих материја;

– графички приказ концентрација у земљишту у функцији времена за испитивану супстанцу и где је прикладно, за главне производе трансформације;

– полуживот или DT50, DT75 и DT90 за испитивану супстанцу и где је прикладно, за главне производе трансформације укључујући интервале поверења;

– процена абиотичке деградације у стерилним условима;

– процена кинетике трансформације за испитивану супстанцу и где је прикладно, за главне производе трансформације;

– предложен пут трансформације, где је прикладно;

– тумачење резултата;

– необрађени подаци (нпр. примери хроматограма, узорци калкулација брзина трансформације и начина за идентификацију производа трансформације).

4. ЛИТЕРАТУРА

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 pesticidesin Canada.

3. European Union (EU), (1995) Commission Directive 95/36/EC of 14 July 1995 amending CouncilDirective 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 vonPflanzenschutzmitteln im Boden – Abbau, Umwandlung und Metabolismus.

6. ISO/DIS 11266-1, (1994) Soil Quality -Guidance on laboratory tests for biodegradation of organicchemicals in soil – Part 1: Aerobic conditions.

7. ISO 14239, (1997) Soil Quality – Laboratory incubation systems for measuring the mineralisation oforganic chemicals in soil under aerobic conditions.

8. SETAC, (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 – Aerobicmetabolism 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, p. 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 (IUPAC1984).

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 andstorage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.

16. Appendix V to Directive 67/548/EEC.

17. Guth, J.A., (1981) Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In Progress inPesticide 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.) AgronomySeries No 9, 2nd Edition.

20. Methods of Soil Analysis (1982) Part 2, Chemical and Microbiological Properties. A.L. Page, R.H. Millerand D.R. Kelney, Eds. Agronomy Series No 9, 2nd Edition.

21. ISO Standard Compendium Environment (1994) Soil Quality – General aspects; chemical and physicalmethods of analysis; biological methods of analysis. First Edition.

22. Mückenhausen, E., (1975) Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischenund 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 ofmicrobial biomass in soils. Soil Biol. Biochem. 10, p. 215-221.

25. ISO 14240-1 and 2 (1997) Soil Quality – Determination of soil microbial biomass – Part 1: Substrateinducedrespiration method. Part 2: fumigation-extraction method.

26. Anderson, J.P.E., (1987) Handling and storage of soils for pesticide experiments. In Pesticide Effects onSoil Microflora. L. Somerville, M.P. Greaves, Eds. Taylor & Francis, 45-60.

27. Kato, Yasuhiro. (1998) Mechanism of pesticide transformation in the environment: Aerobic and biotransformationof pesticides in aqueous environment. Proceedings of the 16th Symposium on Environmental Science of Pesticide, p. 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., Sjödahl-Svensson K., Stenström J., Torstensson L. (1996) Effect offreeze and cold storage of soil on microbial activities and biomass. In Pesticides, Soil Microbiology andSoil Quality, 68-69 (SETAC-Europe).

30. Gennari, M., Negre, M., Ambrosoli, R., (1987) Effects of ethylene oxide on soil microbial content andsome chemical characteristics. Plant and Soil 102, p. 197-200.

31. Anderson, J.P.E. (1975) Einfluss von Temperatur und Feuchte auf Verdampfung, Abbau und Festlegungvon Diallat im Boden. Z. PflKrankh Pflschutz, Sonderheft VII, p. 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, p. 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., p. 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, p. 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, p. 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, p. 1032-1041.

37. Hurle K., Walker A., (1980) Persistence and its prediction. In Interactions between Herbicides and the Soil (R.J. Hance,

Ed.), Academic Press, p. 83-122.

Део други
Напон воде, пољски капацитет земљишта (FC) и капацитет задржавања воде (WHC)[XLI]

Висина воденог стуба (cm)	pF[XLII]	bap[XLIII]	Напомене
107	7	104	Суво земљиште
1,6 x 104	4,2	16	Тачка увенућа
104	4	10	
103	3	1	
6 x 102	2,8	0,6	
3,3 x 102	2,5	0,33[XLIV]	Опсег пољског капацитета тла[XLV]
102	2	0,1	
60	1,8	0,06	
33	1,5	0,033	
10	1	0,01	WHC (приближно)
1	0	0,001	Тло засићено водом

Напон воде мери се у центиметрима воденог стуба или у барима. Захваљујући великом опсегу сукцијске тензије, изражава се као pF вредност која је еквивалент логаритму cm воденог стуба.

Пољски капацитет се дефинише као количина воде која се може задржати у земљишту супротно сили теже два дана након дужег кишног периода, или након довољно наводњавања. Одређује се у непоремећеном земљишту на терену *in situ*. Мерења нису примењива на поремећене лабораторијске узорке земљишта. FC-вредности одређене у поремећеним земљиштима могу показати велике системске варијансе.

Капацитет задржавања воде[XII] (water holding capacity, у даљем тексту: WHC) одређује се у лабораторији са непоремећеним и поремећеним земљиштима засићењем земљишног стуба водом, капиларним транспортом. Посебно је корисно за поремећена земљишта и може бити и до 30% већи од пољског капацитета. Испитивањем је лакше одредити WHC од поуздане FC-вредности.

_____

XLI Mückenhausen, E. (1975). Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen. DLG-Verlag, Frankfurt, Main.

XLII pF = log висине воденог стуба

XLIII 1 бар = 105 Pa

XLIV Одговара приближном садржају воде од 10% у песку, 35% у иловачи и 45% у глини.

XLV Пољски капацитет није константан него варира са типом земљишта између pF 1,5 и 2,5.

Део трећи
Садржај влаге у тлу (g воде на 100 g сувог тла) различитих типова земљишта из различитих држава

тип земљишта	држава	садржај влаге у тлу при		
		WHC*	pF = 1,8	pF = 2,5
Песак	Немачка	28,7	8,8	3,9
Песак са иловачом	Немачка	50,4	17,9	12,1
Песак са иловачом	Швајцарска	44,0	35,3	9,2
Муљевита иловача	Швајцарска	72,8	56,6	28,4
Глинена иловача	Бразил	69,7	38,4	27,3
Глинена иловача	Јапан	74,4	57,8	31,4

Пешчана иловача	Јапан	82,4	59.2	36,0
Муљевита иловача	САД	47,2	33,2	18,8
Пешчана иловача	САД	40,4	25,2	13,3
* Капацитет задржавања воде (water holding capacity)				

Део четврти

Слика 1: Пример проточне апаратуре за испитивање трансформације хемикалија у земљишту[XLVI, XLVII]

При чему је:

1 – игличасти вентил;

2 – боца за испирање ваздухом која садржи воду;

3 – ултрамембрана (само стерилни услови) величина пора: 0,2 μм;

4 – боца за метаболизам земљишта (урођена у воду само за аеробне услове и услове пиринчаних поља);

5 – етиленгликол за хватање органских испарљивих једињења;

6 – сумпорна киселина за хватање алкалних испарљивих једињења;

7, 8 – натријум хидроксид за хватање CO_2 и других киселих испарљивих материја;

9 – мерач протока.

Слика 2: Пример боца типа биометра за испитивање трансформације хемикалија у земљишту[XLVIII]

_____

XLVI Guth, J.A. (1980). The study of transformations. In Interactions between Herbicides and the Soil (R.J. Hance, Ed.), Academic Press, 123-157.

XLVII 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.

XLVIII Anderson, J.P.E. (1975). Einfluss von Temperatur und Feuchte auf Verdampfung, Abbau und Festlegung von Diallat im Boden. Z. PflKrankh Pflschutz, Sonderheft VII, p.141-146.

C.24. АЕРОБНЕ И АНАЕРОБНЕ ТРАНСФОРМАЦИЈЕ У СИСТЕМИМА ВОДА – СЕДИМЕНТ

Део први

1. МЕТОДА ИСПИТИВАЊА

Метода се заснива на Упутству за испитивање OECD 308 (2002).

1.1. УВОД

Хемикалије доспевају у плитке или дубоке површинске воде услед непосредне примене, путем распршивања, спирања, дренаже, одлагања отпада, отпадних вода из индустрије, домаћинстава или пољопривреде и атмосферског таложења. Ова метода испитивања описује лабораторијски поступак за процену аеробне и анаеробне конверзије органских хемикалија у

системима вода–седимент. Метода се заснива на упутствима која су наведена у литератури[1, 2, 3, 4, 5, 6]. Број и тип седимената који се користе у овом испитивању утврђен је на OECD радионици о избору земљишта/седимента[7]. Том приликом дате су препоруке за сакупљање, руковање и складиштење узорака седимената засноване на ISO стандарду[8]. Испитивање је неопходно за хемикалије које се непосредно додају у воду или доспевају у воду осталим наведеним путевима.

Услови у природним системима вода–седимент су често аеробни у горњој воденој фази. Површински слој седимента је или аеробан или анаеробан, док је дубљи седимент најчешће анаеробан. Да би се обухватиле све ове могућности, појединачно су описана и аеробна и анаеробна испитивања. Аеробно испитивање симулира аеробни водени стуб изнад аеробног слоја седимента који је наглашен анаеробним градијентом. Анаеробно испитивање симулира потпуно анаеробни систем вода–седимент. У случају значајног одступања од наведених поставки, нпр. када се користе интактна седиментна језгра или седименти који су већ били изложени испитиваним супстанцама, на располагању су друге методе испитивања[9].

1.2. ДЕФИНИЦИЈЕ

Користе се стандардне међународне мерне јединице (SI).

Испитивана супстанца јесте било која супстанца, било да је у питању полазна супстанца или одговарајући производи конверзије.

Производи трансформације јесу све супстанце које проистичу из биотичких и абиотичких реакција трансформације испитиване супстанце укључујући и CO_2 и везане остатке.

Везани остаци јесу једињења у земљишту, биљкама или животињама која опстају у матриксу било у облику полазне супстанце, или њених метаболита након процеса екстракције. Метода екстракције не сме не сме да доведе до значајне измене самих једињења или структуре матрикса. Природа везе може се делом објаснити методама екстракције које мењају матрикс и софистицираним аналитичким техникама. До данас су, нпр. на овај начин откривене коваленте јонске и сорптивне везе, као и молекулске клопке. У принципу, образовање везаних остатака значајно смањује биодоступност и биорасположивост[10] (модификовани IUPAC 1984[11извештај]).

Аеробна конверзија јесу оксидујуће реакције које се одвијају у присуству молекуларног кисеоника[12].

Анаеробна конверзија јесу редукујуће реакције које се одвијају у одсуству молекуларног кисеоника[12].

Природне воде јесу површинске воде из језера, река или потока итд.

Седимент јесте мешавина неорганских и органских хемијских састојка. Органски састојци садрже једињења са високим садржајем угљеника и азота и високе молекулске масе. Таложи се путем природне воде и интегрише се са том водом.

Минерализација јесте потпуна разградња неког органског једињења до CO_2, H_2O у аеробним условима, или до CH_4, CO_2 и H_2O у анаеробним условима. У овој методи испитивања, када се користи једињење обележено радиоизотопом, минерализација означава свеобухватну разградњу молекула у току које се обележени атом угљеника оксидује или се редукује сразмерно ослобођеној количини $C^{14}O_2$ или $C^{14}H_4$.

Време полураспада ($t_{0,5}$) јесте време потребно за конверзију 50% испитиване супстанце, у случају када се конверзија може објаснити кинетиком првог реда, независно од почетне концентрације.

Време полураспада 50 (у даљем тексту: DT_{50}) јесте време током којег је почетна концентрација испитиване супстанце смањена за 50%.

Време полураспада 75 (у даљем тексту: DT_{75})јесте време током којег је почетна концентрација испитиване супстанце смањена за 75%.

Време полураспада 90 (у даљем тексту: DT_{90})јесте време током којег је почетна концентрација испитиване супстанце смањена за 90%.

1.3. РЕФЕРЕНТНЕ СУПСТАНЦЕ

Референтне супстанце се користе за индентификацију и квантификацију производа конверзије уз помоћ спектроскопских и хроматографсих метода.

1.4. ПОДАЦИ О ИСПИТИВАНИМ СУПСТАНЦАМА

Необележене испитиване супстанце као и испитиване супстанце обележене изотопима могу се користити у мерењу стопе трансформације иако се за ово препоручује обележени материјал. Обележени материјал је потребан за проучавање путева трансформације и за утврђивање масеног биланса. C^{14} означавање се препоручује али и употреба осталих изотопа као што су C^{13}, N^{15}, H^{3}, P^{32}, може бити корисна. Кадагод је могуће, изотопска ознака треба да буде уграђена у најстабилнији део молекула[XLIX]. Хемијска, односно радиохемијска чистоћа испитиване супстанце је најмање 95%. Пре почетка испитивања неопходне су следеће информације о супстанци која се испитује:

– растворљивост у води (видети методу А.6. у Прилогу 1 овог правилника);

– растворљивост у органским растварачима;

– притисак при испаравању (видети методу А.4. у Прилогу 1 овог правилника) и Хенријева константа;

– коефицијент расподеле у систему*n*-октанол/вода (видети методу А.8. у Прилогу 1 овог правилника);

– коефицијент адсорпције – K_d, K_f или K_{oc}, када је могуће (видети методу С.18. овог прилога);

– хидролиза (видети методу С.7. овог прилога);

– константа дисоцијације – pK_a (смернице OEBS 112)[13];

– хемијска структура испитиване супстанце и место везивања изотопа, уколико је могуће.

Напомена: забележити температуру на којој су рађена мерења.

Корисно је имати и податке о токсичности испитиване супстанце помикроорганизме, податке о брзој, односно инхерентној биоразградљивости и податке о аеробној и анаеробној конверзији у земљишту.

Потребно је да буду доступне аналитичке методе (укључујући и методе екстракције и испирања) за идентификацију и квантификацију испитиване супстанце и производа њене конверзије у води и седименту (видети одељак 1.7.2. ове методе).

_____

XLIX На пример, уколико супстанца садржи само један прстен, он се обавезно обележава. Уколико испитивана супстанца садржи два или више прстенова, могубити неопходна појединачна истраживања да би се проценила судбина сваког обележеног прстена и добили одговарајући подаци о формирању производа конверзије.

1.5. ПРИНЦИП МЕТОДЕ ИСПИТИВАЊА

У испитивању се користи аеробни и анаеробни систем вода-седимент (видети Део други ове методе) који омогућава:

– мерење стопе конверзије испитиване супстанце у систему вода-седимент;

– мерење стопе конверзије испитиване супстанце у седименту;

– мерење стопе минерализације испитиване супстанце, односно продуката конверзије (када се користи испитивана супстанца обележена радиоизотопом C^{14});

– идентификацију и квантификацију производа конверзије у води и седименту укључујући и масени биланс (када се користи обележена испитивана супстанца);

– мерење дистрибуције испитиване супстанце и њених производа конверзије између две фазе у периоду инкубације у замраченим условима на константној температури (да би се избегло, нпр. цветање алги). DT_{50}, DT_{75} и DT_{90} вредности се одређују у кратком року након испитивања и не могу бити изведене много после периода испитивања (видети одељак 1.2. ове методе).

Потребна су најмање два типа седимента и одговарајућих узорака воденог стуба како за аеробно тако и за анаеробно испитивање[7]. Постоје случајеви када би требало користити више од два типа седимента, нпр. за хемикалије које се могу наћи у слатководном, односно морском окружењу.

1.6. ПРИМЕНА МЕТОДЕ

Метода се у већини случајева примењује за испитивање супстанци (обележених или необележених) за које постоји довољно прецизан и осетљива налитички поступак. Примењује се на једињења која су минимално испарљива, неиспарљива, растворљива и нерастворна у води. Ова испитивања не примењивати на хемикалије које су високо испарљиве из воденог раствора (нпр. фумиганти, органски растварачи) и због тога се у не могу задржати у води, односно седименту под испитиваним условима.

До сада се овај метод примењивао да би се изучиле конверзије хемикалија у слаткој води и седиментима, али може применити и на естуарске/морске екосистеме. Није препоручљиво да се симулирају услови у текућим водама (нпр. реке) или отвореном мору.

1.7. КРИТЕРИЈУМ КВАЛИТЕТА

1.7.1. Ефикасност примењене аналитичке технике

Екстракција и анализа, најмање у дупликату, свих узорака воде и седимента, одмах након додавања испитиване супстанце, даје прве индикације о ефикасности аналитичке методе и идентичности поступака који се примењују на супстанце. Ефикасност у каснијим фазама испитивања су дата у одговарајућем балансу масе (онда када се користи обележени материјал). Ефикасност је у опсегу од 90% до 110% за обележене хемикалије[6] и од 70% до 110% за необележене хемикалије.

1.7.2. Поновљивост и осетљивост аналитичке методе

Поновљивост аналитичке методе (искључујући иницијалну ефикасност екстракције) ради квантификације испитиване супстанце и производа трансформације се може проверавати поновљеном анализом (два понављања) истог екстракта воде или узорка седимента који су били инкубирани довољно дуго да би се формирали производи трансформације.

Граница детекције (LOD) аналитичке методе за испитиване супстанце и производе конверзије је најмање 0,01 mg/kg у води или седименту (као испитивана супстанца) или 1% почетне количине која је примењена на испитивањални систем. Као граница детекције примењује се увек нижа вредност. Такође навести границу квантификације (LOQ).

1.7.3. Прецизност података конверзије

Регресиона анализа концентрације испитиване супстанце у функцији времена даје одговарајуће информације о прецизности криве конверзије и омогућава израчунавање интервала поверења за вредности полураспада (ако се може применити псеудо кинетика првог реда) или вредности DT_{50} и ако више одговара, вредности DT_{75} и DT_{90}.

1.8. ОПИС МЕТОДЕ

1.8.1. Испитивањални систем и апаратура

Истраживање се спроводи у стакленим посудама (нпр. флаше, кивете), осем уколико претходне информације (попут коефицијента расподеле у систему *n*-октанол/вода, подаци о сорпцији, итд.) покажу да испитивана супстанца пријања уз стакло, у том случају се користи алтренативни материјал (као што је тефлон). Ако је познато да испитивана супстанца пријања уз стакло могуће је превазићи овај проблем коришћењем једног или више наведених поступака:

– одредити масу испитиване супстанце и производа конверзије који пријањају уз стакло;

– на крају испитивања обезбедити испирање судова растварачем;

– коришћење формулисаних производа (видети одељак 1.9.2. ове методе);

– увећавањем количине ко-растварача ради додавања испитиване супстанце у систем; уколико се користи ко-растварач онда је он такав да не раствори испитивану супстанцу.

Примери типичне испитиване апаратуре односно гас-проточног и биометарског система, су дати у Делу трећем и четвртом[14]. Остали корисни инкубациони системи су описани у литератури[15]. Дизајн апаратуре која се користи при експерименту би требало да омогући размену ваздуха или азота и хватање испарљивих производа. Димензије апаратуре су такве да испуњавају услове који се захтевају у испитивању (видети одељак 1.9.1. ове методе). Вентилација се може обезбедити било лаганим мешањем или пропуштањем ваздуха или азота по воденој површини. У другом случају препоручљиво је лагано мешање воде одозго ради боље дистрибуције кисеоника или азота у води. Ваздух који не садржи CO_2 се не користи јер би то довело до повећања pH воде. У сваком случају поремећаји седмента су непожељни и избегавају се колико год је то могуће. Благо испарљиве хемикалије да се испитују у систему биометарског типа при лаганом мешању водене површине. Користе се и затворене посуде са слободним простором на врху, било за атмосферски ваздух или азот и унутрашњим системом који служи за задржавање испарљивих производа конверзије[16]. Код испитивања аеробних конверзија неопходна је редовна размена гаса на врху епрувете да би се компензовала потрошња кисеоника од стране биомасе.

За сакупљање испарљивих производа конверзије користи се 1 mol/dm^3 раствора натријум-хидроксида или калијум-худроксида за угљен диоксид[L] и етилен глукол, етаноламин или 2% парафинске киселине за органска једињења. Испарљива једињења која настају у анаеробним условима, као што је метан, могу се сакупити нпр. помоћу молекулских сита. Таква испарења се нпр. сагоревају до CO_2 приликом пропуштања гаса кроз кварцну цев напуњену са CuO на температури од 900 °C и хватањем насталог CO_2 у абсорбер са базама[17].

Потребни су лабораторијски мерни инструменти за хемијску анализу испитиване супстанце и производа конверзије (нпр. хроматографија течног гаса – GLC, течна хроматографија високих перформанси – HPLC, хроматографија танког слоја – TLC, спектроскопија масе – MS), хроматографија гаса – спектроскопија масе – GC-MS, течна хроматографија – спектроскопија масе – LC-MS, нуклеарна магнетска резонанца – NMR, итд), укључујући и системе за откривање хемикалија које су обележене или необележене радиоизотопима, када је то могуће. Када се користи материјал радио изотопски обележен такође је потребан и течни сцинтилациони бројач и оксидант сагоревања (за сагоревање узорака седимента пре радиоактивне анализе).

По потреби, може бити неопходна и остала стандардна лабораторијска опрема за физичко хемијска и биолошка одређивања (видети Табелу 1. у одељку 1.8.2.2. ове методе), лабораторијско стакло, хемикалије и реагенси.

_____

L Како ови алкални апсорпциони раствори апсорбују и угљен диоксид из вентилационог ваздуха и угљен диоксид који настаје у прецесудисањапри аеробном испитивању, они се замењују у редовним интервалима да би се избегло њиховозасићење, а тиме и губитак апсорбционог капацитета.

1.8.2. Избор и број узорака водених седимената

Место за узимање узорка седимента се одређује за сваку посебну ситуацију у складу са сврхом испитивања. Приликом избора места за узимање узорка, узети у обзир претходни утицај пољопривреде, индустрије и домаћинстава на сливно подручје, као и на сектор непосредно узводно од локалитета. Седименти се не смеју користити уколико су загађени испитиваном супстанцом или њеним структурним аналозима у претходне четири године.

1.8.2.1. Избор седимента

Два типа седимента се обично користе при аеробним студијама[7]. Два изабрана узорка седимента се разликују по

садржају органског угљеника и гранулометријском саставу. Један седимент има висок садржај органског угљеника (2,5-7,5%) и доминантно га чине фине фракције, а други седимент има нижи садржај органског угљеника (0,5-2,5%) и доминирају крупне фракције. Разлика у садржају органског угљеника је најмање 2%. Муљевито – глиновити[LI] седимент садржи > 50% фине фракције, за разлику одглиновито – муљевитог седимента код кога је тај садржај < 50%. Разлика између садржаја муља и глине два седимента је најмање 20%. У случајевима када хемикалија доспе у морске воде, најмање један од система седимент – вода је морског порекла.

За стриктно анаеробна истраживања, два узорка седмимента (укључујући и припадајуће воде) узети из анаеробних зона површинске воде[7]. И узорци воде и узорци седимента се пажљиво транспортују без присуства кисеоника.

Остали параметри који могу бити од важности приликом избора седимента посматраће се од случаја до случаја. Нпр. pH вредност седимента је важан параметар за испитивање хемикалија чија разградљивост, односно сорпција зависи од pH вредности. pH зависност може да се огледа преко pK_a испитиване супстанце.

_____

LI Глина – муљ јеминерална фракцијаседиментавеличине< 50 μm.

1.8.2.2. Карактеризација узорака система вода-седимент

Кључни параметри који се мере и бележе (уз навођење употребљене методе) како у води тако и у седименту, као и временска динамика мерења, наведени су у табели испод. Информативно, методе за одређивање ових параметара дате су у литератури[17, 18, 19, 20]. Зависно од случаја указује се потреба за мерењем и приказивањем вредности и других параметара (нпр. за свежу воду – честице, алкалитет, тврдоћа, проводљивост, NO_3/PO_4 однос и појединачне вредности; за седименте – јонска измена, водни капацитет, карбонати, укупни азот и фосфор; за морске системе – салинитет). Анализа седимената и воде na нитрате, сулфате, биодоступно гвожђе и могуће друге електрон акцепторе може бити од користи у процени редукционих процеса, нарочито код анаеробне трансформације.

Мерење параметара за карактеризацију узорака система седимент – вода[7, 21, 22]

	Фаза поступка					
	узимање узорака на терену	накнадно руковање узорком	почетак аклима-тизације	почетак испи-тивања	у току испи-тивања	крај испи-тивања
Вода						
Порекло/ извор	x					
Температура	x					
pH	x		x	x	x	x
TOC			x	x		x
Конц. O_2[LII]	x		x	x	x	x
Оксидо-редукциони потенцијал[XLVII]			x	x	x	x
Седимент						
Порекло/ извор	x					
Дубина слоја	x					
pH		x	x	x	x	x
Грануло-метријски састав		x				
TOC		x	x	x		x
Биомаса микроорга-низама		x		x		x
Оксидо-редукциони потенцијал[LIII]	Опажање (боја/ мирис)		x	x	x	x

_____

LII Метода стопе микробне респирације[26], метод фумигације[27] или бројање на Петријевим шољама (нпр. број бактерија, актиномицета, гљива и укупан број колонија) за аеробне студије, а стопа метаногенезе за анаеробне студије.

LIII Резултати новијих истраживања су показали да мерења концентрације кисеоника у води и оксидационо редукционог потенцијала немају ни механистичку нити вредност у циљу предвиђања раста и развоја популације микроорганизама у површинским слојевима вода[24, 25]. Одређивање биохемијске потрошње кисеоника (БПК), приликом узимања узорака на терену, на почетку и на крају испитивања) и концентрација микро/макро нутријената Ca, Mg и Mn (на почетку и крају испитивања) у води као и укупни N и укупни P у седименту (приликом узимања узорака на терену и на крају испитивања) представљају боље параметре за тумачење и процену и стопе и путева биотрансформације.

1.8.3. Сакупљање, руковање и складиштење

1.8.3.1. Сакупљање

За узорковање седимента дна користи се ISO стандард[8] Узорци се узимају из горњег слоја седимента дубине 5 cm до 10 cm. Вода која се користи узима се са истог места или локације и у исто време када и седимент. За анаеробну студију, узорци седимента и воде који се користе узети су без кисеоника[27] (видети одељак 1.8.2.1. ове методе). Неки од уређаја за узимање узорака описани су у литератури[8, 22].

1.8.3.2. Руковање

Седимент се одваја филтрацијом кроз сито промера 2 mm помоћу вишка воде која се потом одбацује. Позната количина седимента и воде меша се у потребном односу (видети одељак 1.9.1. ове методе) у инкубационим боцама и припрема за период инкубације (видети одељак 1.8.4. ове методе). За анаербону студију сви кораци у поступку се спроводе без присуства кисеоника[28, 1, 30, 31, 32].

1.8.3.3. Складиштење

Препоручује се коришћење свежег седимента и воде, али уколико је потребно складиштење, седимент и вода се просејавају на горе описан начини и складиште се заједно, водени стуб (6 cm до 10 cm воденог слоја), у мрачној просторији, најдуже две недеље[7, 8, 22] на температури од (4 ± 2)° C. Узорци који се користе у аеробним студијама се складиште тако да имају доток ваздуха (нпр. отворени контејнери), док се они који се користе за анаеробне студије складиште без кисеоника. Замрзавање седимента и воде или исушивање седимента се не сме догодити у току транспорта и складиштења.

1.8.4. Припрема узорака седимента/воде за испитивање

Период аклиматизације је пре додавања испитиване супстанце и сваки од узорака седимент/вода који се користи у главном испитивању ставља се у инкубациони суд. Аклиматизација је под истим условима као и инкубација (видети одељак 1.9.1. ове методе). Под периодом аклиматизације се подразумева временски период потребан за постизање одређене стабилности, на шта указују pH вредност, концентрација кисеоника у води, оксидо-редукциони потенцијал седимента у води и макроскопска подела фаза. Период аклиматизације уобичајено траје једну до две недеље, а не би требало да траје дуже од четири недеље. Резултате испитивања која су урађена у овом периоду забележити.

1.9. ИЗВОЂЕЊЕ ИСПИТИВАЊА

1.9.1. Услови под којима се обавља испитивање

Испитивање се изводи у инкубционој апаратури (видети одељак 1.8.1. ове методе) у запреминском односу вода: седимент између 3:1 и 4:1 и слоја седимента дубине 2,5 cm (± 0,5 cm)[LIV]. Минимална препоручена количина седимента је 50 g суве масе по инкубационом суду.

Испитивање се изводи у мрачној просторији на уједначеној температури од 10° C до 30° C. Одговарајућа температура је 20° C ± 2° C. Уколико је могуће, зависно од случаја до случаја, може се узети у обзир додатна нижа температура (нпр. 10° C), зависно од информације која се добија из испитивања. Инкубациона температура се контролише и бележи.

_____

LIV Препоручује се количина од најмање 50 g седимента (суве масе) по инкубационој посуди.

1.9.2. Припрема и увођење испитиване супстанце

Користи се увек једна доза испитиване хемикалије[LV]. У случајевима у којима су средства за заштиту биља директно унета у воду, сматра се да је максимално дозвољена количина наведена на етикети датог средства максимална концентрација на површини суда у коме се обавља експеримент. Користи се максимална доза која је дата на етикети. У свим осталим случајевима, концентрација која се користи базира се на прорачунима из емисија у животну средину. Води се рачуна да се обезбеди примена одговарајуће количине испитиване супстанце како би се извршила карактеризација путева конверзије, као и образовање и разградња производа конверзије. Можда је потребно употребити веће дозе (нпр. 10 пута) у ситуацијама када су концентрације испитиване супстанце близу границе детекције на почетку студије, односно када се главни продукти конверзије не могу одмах опазити када су присутни у уделу од најмање 10% у односу на испитивану супстанцу. Међутим,

уколико се користе веће испитиване концентрације оне не би требало да имају значајније штетно дејство на активности микроорганизама система вода-седимент. Да би се постигла стална концентрација испитиване супстанце у посудама различитих димензија, може се узети у обзир прилагођавање количине материјала који се користи, на основу дубине воденог стуба у посуди у односу на дубину воде на терену (претпоставља се да је 100 cm, али и остале дубине се могу узети у обзир). Пример калкулације видети у Делу петом ове методе.

У идеалним околностима испитивана супстанца се примењује као водени раствор у воденој фази система за испитивање. Уколико се не може избећи, дозвољено је коришћење мале количине растварача који се мешају са водом (као што је ацетон, етанол) ради употребе и дистрибуције испитиване супстанце, али она не сме да буде већа од 1% v/v и не сме да има штетно дејство на микробну активност система за испитивање. Треба обратити пажњу на сакупљање воденог раствора испитиване супстанце – коришћење генератора колоне и претходно мешање се може користити да би се обезбедила тотална хомогеност. Након додавања воденог раствора у испитивањални систем, препоручује се лагано мешање водене фазе, водећи рачуна да се што мање нарушава седимент.

Не препоручује се рутинско коришћење формулисаних продуката пошто састојци формулације могу да утичу на распоред испитиване супстанце, односно производа конверзије између водене и седиментне фаза. Међутим, коришћење формулисаних материјала може бити одговарајућа алтернативе за супстанце које се слабо растварају у води.

Број инкубационих посуда зависи од различите дужине времена приликом узимања узорака (видети одељак 1.9.3. ове методе). Требало би укључити довољно велики број испитиваних система да би се два екпериментална система могла жртвовати при сваком узорковању. Када се користе контролне јединице сваког система вода-седимент, не би требало да се држе заједно са испитиваном супстанцом.

Контролне јединице се могу користити за одређивање биомасе микроорганизама седимента и укупног органског угљеника воде и седимента приликом завршетка студије. Две контролне јединице (односно једна контролна јединица за сваки систем вода седимент) се може користити да би се пратили тражени параметри у седименту и води у току периода аклиматизације (видети табелу у одељку 1.8.2.2. ове методе). Две додатне контролне јединице укључити у случају да се испитивана супстанца примењује путем растварача да би се измерила штетна дејства на активности микроорганизама у испитивањалном систему.

_____

LV Испитивање са другом концентрацијом може бити од користи за хемикалије које доспевају у површинске воде различитим путевима уноса и као резултат имају драматично различиту концентрацију, све док се нижа концентрација може анализирати са довољном прецизношћу.

1.9.3. Трајање испитивања и узимање узорака

Експеримент не би требало да траје дуже од 100 дана[6], и наставља се све док се не успоставе путеви конверзије и дистрибуције воде/седиметна или када када дође до распада испитиване супстанце од 90% било разградњом, односно испаравањем. Број узорака у току трајања испитивања би требало да буде најмање шест (укључујући и нулто време), уз коришћење опционе прелиминарне студије (видети одељак 1.9.4. ове методе) да би се установио правилан режим узимања узорака и дужина трајања испитивања, осем уколико не постоје довољне информације о испитиваној супстанци из претходних студија. За хидрофобне супстанце, у току иницијалног периода студије је можда потребно узети додатне узорке, да би се одредила стопа дистрибуције између воде и седиментих фаза.

При одговарајућем времену узорковања, цели инкубациони судови (у копији) се склањају ради анализе. Седимент који се налази у води анализира се посебно[LVI]. Површинске воде се пажљиво уклањају уз минимално узнемиравање седимента. Екстракција и карактеризација испитиване супстанце и производа конверзије прати одговарајуће аналитичке процедуре. Треба водити рачуна да се уклони материјал који се абсорбовао у инкубационом суду или у повезаним епруветама које се користе за сакупљање испарења.

_____

LVI У случајевима када може да дође до рапидне ре-оксидације анаеробних производа разградње, анеробни услови се одржавају током анализе и узимања узорака

1.9.4. Опциона прелиминарна студија

Уколико се режим узимања узорака и његова дужина не могу одредити из осталих релевантних студија на испитиваној супстанци, може се узети у разматрање опционо прелиминарно испитивање, која се изводи у истим условима који су предложени за крајњу студију. У случају да се прелиминарно испитивање изводи, укратко навести меродавне услове испитивања и добијене резултате.

1.9.5. Мерења и анализе

Концентрација испитиване супстанце и производа конверзије при сваком узорковању у води и седименту мери се и записује (или као концентрација или као проценат од нанете супстанце). У било ком времену узимања узорака идентификују се производи конверзије уочени на ≥ 10% примењене радиоактивности у укупном систему вода-седимент, осим уколико не постоје оправдани разлози да се другачије поступи. Приликом идентификације узимају се у обзир и производи конверзије чије се концентрације константно повећавају током испитивања, чак и ако њихове концентрације не прелазе утврђене

нивое, јер ово указује на њихову перзистенцију. Перзистентност супстанце се разматра од случаја до случаја и образлаже у извештају.

Резултати добијени из система за хватање гасова/испарења (CO_2 и остали, односно испарљива органска једињења) бележе се при сваком узорковању. Стопе минерализације се бележе. Неиздвојиви (везани) остаци у седименту се бележе приликом сваког узимања узорака.

2. ПОДАЦИ

2.1. ПОСТУПАЊЕ СА РЕЗУЛТАТИМА

Укупан масени баланс или ефикасност (видети одељак 1.7.1. ове методе) додате радиоактивности се израчунава при сваком узимању узорака. Резултати се бележе као проценат додате радиоактивности. Дистрибуција радиоактивности између воде и седимента се бележе или као концентрација или као проценат, при сваком узимању узорака.

DT_{50} и уколико је могуће, DT_{75} и DT_{90} испитиване супстанце се израчунава заједно са одговарајућим интервалима поверења (видети одељак 1.7.3. ове методе). Подаци о стопи расипања испитиване супстанце у води и седименту се могу добити коришћењем одговарајуће псеудо кинетике првог реда, односно технике емпиријског одређивања криве која примењује графичка или нумеричка решења или још комплекснијих процена у виду појединачних или мулти-димензионалних модела. Детаљније видети у литератури[34,35, 36].

Сви ови приступи имају своје добре и лоше стране и значајно варирају у својој комплексности. Претпостављена кинетика првог реда може бити претерано поједностављење конверзије и процеса расподеле, али када је год је то могуће даје временску одредницу (стопу константе или полуживот), која се једноставно разуме и од великог је значаја у моделима симулације и калкулацијама процеса конверзије и расподеле предвиђених концентрација у животној средини. Емпиријски приступи или линеарна трансформација могу довести до бољег прилагођавања криве подацима и допринети бољој процени полуживота, DT_{50} и кад год је могуће, вредности DT_{75} и DT_{90}. Коришћење изведених константи је ограничено. Модели одвојених посуда могу генерисати знатан број корисних вредносних константи у процени ризика које описује стопу конверзије у различитим посудама и расподеле хемикалије. Избор методе у сваком случају се оправдава а експериментатор графички или статистички документује да је избор метода одговарајући.

3. ИЗВЕШТАВАЊЕ

3.1. ИЗВЕШТАЈ О ИСПИТИВАЊУ

Извештај садржи податке о:

1) испитиваној супстанци:

– уобичајени назив, хемијски назив, CAS број, структурну формулу (назначити позицију изотоп када се користи радио обележени материјал) и релевантна физичка и хемијска својства;

– чистоћа (нечистоћа) испитиване супстанце;

– радиохемијска чистоћа обележене хемикалије и активности молекула (када је то могуће);

2) референтним супстанцама:

– хемијски назив и структура референтне супстанце која се користи за карактеризацију, односно идентификацију производа конверзије;

– Седимент и вода коришћени у испитивању:

– локација и опис места на коме су узети узорци седимента, укључујући, уколико их имамо, податке о претходном загађењу;

– све информације везане за сакупљање, складиштење (уколико постоје) и аклиматизацију система вода-седимент;

– својства система вода-седимент на начин приказан у табели у одељку 1.8.2.2;

3) условима под којима се обавља испитивање:

– испитивањални систем који се користи (нпр. проточни систем, биометар, начин вентилације, метод мешања, запремина воде, маса седимента, висина воде и седиментног слоја, димензије посуда у којима се обавља испитивање, итд.

– увођење испитиване супстанце у испитивањални систем: коришћена концентрација, број дупликата и контрола, начин примене испитиване супстанце (нпр. коришћење растварача уколико их има), итд;

– температура инкубације;

– време узимања узорака;

– екстракционе методе и ефикасност као и аналитичке методе и границе детекције;

– методе за карактеризацију/идентификацију производа конверзије;

– одступања од протокола методе испитивања или услова у којим се одвија испитивање у току студије;

4) резултатима:

– необрађени подаци репрезентативних анализа (сви необрађени подаци се архивирају у складу са принципима добре лабораторијске праксе – GLP);

– поновљивост и осетљивост коришћеног аналитичког метода;

– ефикасност аналитичке технике (% вредности валидне студије су дати у одељку 1.7.1);

– табеле са резултатима изражене у % примењене дозе и у mg/kg воде, седимента и укупног система (само у %) за испитивану супстанцу и уколико је могуће за производе конверзије и неиздвојиву радиоактивност;

– масени баланс у току и на крају испитивања;

– графички приказ транформације посебно у води и седименту као и у укупном систему (укључујући и минерализацију);

– стопе минерализације;

– полуживот, DT_{50} и уколико је могуће, DT_75 и DT_{90} вредности за испитивану супстанцу, и где постоји могућност за главне производе конверзије, укључити и интервале поверења у води седименту и укупном систему;

– процена кинетике трансформације испитиване супстанце, и када је могуће главних производа конверзије;

– предложене путеве трансформације, када је то могуће;

– продискутовати резултате.

4. ЛИТЕРАТУРА

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. p. 35-37.

5. US-EPA: Pesticide assessment guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental fate (1982) Section 162-3, Anaerobic aquatic metabolism.

6. SETAC-Europe publication., (1995) Procedures for assessing the environmental fate and eCOtoxicity of pesticides. Ed. Dr Mark R. Lynch. SETAC-Europe, Brussels.

7. OECD Test Guidelines Programme., (1995) Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/sediments, Belgirate, Italy, 18-20 January 1995.

8. ISO/DIS 5667-12., (1994) Water quality – Sampling – Part 12: Guidance on sampling of bottom sediments.

9. US-EPA (1998a) Sediment/water microcosm biodegradation test. Harmonised Test Guidelines (OPPTS 835.3180). EPA 712-C-98-080.

10. DFG: Pesticide Bound Residues in Soil. Wiley-VCH (1998).

11. T.R. Roberts: Non-extractable pesticide residues in soils and plants. Pure Appl. Chem. 56, 945-956 (IUPAC 1984).

12. OECD Test Guideline 304A: Inherent Biodegradability in Soil (adopted 12 May 1981).

13. OECD (1993): Guidelines for Testing of Chemicals. Paris. OECD (1994-2000): Addenda 6-11 to Guidelines for the Testing of Chemicals.

14. Scholz, K., Fritz R., Anderson C. and Spiteller M. (1988) Degradation of pesticides in an aquatic model ecosystem. BCPC – Pests and Diseases, 3B-4, p. 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, p. 631-637.

17. Steber, J., Wierich, P. (1987) The anaerobic degradation of detergent range fatty alCOhol ethoxylates. Studies with 14C-labelled model surfactants. Water Research 21, p. 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, p. 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, p. 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, p. 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, p. 197-203.

27. ISO-14240-2., (1997) Soil quality – Determination of soil microbial biomass – Part 2: Fumigationextraction 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), p. 13-21.

29. Shelton, D.R. and Tiedje, J.M. (1984) General method for determining anaerobic biodegradation potential. App. Environ. Microbiol. 47, p. 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, p. 1527-1550.

31. Pagga, U. and Beimborn, D.B. (1993) Anaerobic biodegradation tests for organic Compounds. Chemoshpere 27, p. 1499-1509.

32. Nuck, B.A. and Federle, T.W., (1986) A batch test for assessing the mineralisation of ^{14}C-radiolabelled Compounds under realistic anaerobic Conditions. Environ. Sci. Technol. 30, p. 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, p. 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, p. 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, p. 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, p. 1349-1354.

Део други
СМЕРНИЦЕ ЗА АЕРОБНЕ И АНАЕРОБНЕ СИСТЕМЕ за испитивање

Аеробни систем за испитивање

Аеробни систем за испитивање описан у овој методи испитивања састоји се од аеробног воденог слоја (типична концентрација кисеоника варира од 7 mg/l до 10 mg/l) и седиментног слоја, који је аеробан на површини а анаеробни испод површине (типични просечни редокс потенцијал (Ex) у анаеробној зони седимента варира од - 80 mV до – 190 mV). Влажни ваздух се пушта по површини воде у свакој инкубационој јединици да би се одржао одговарајући ниво кисеоника у свакој горњем делу суда.

Анаеробни систем за испитивање

За анаеробне испитиване системе, поступак испитивања је у суштини исти као и код описаног аеробног система, са изузетком да се влажни азот пушта по површини воде у свакој инкубационој јединици да би се одржао ново азота у горњем делу суда. Седимент и вода се сматрају анаеробним ако је редокс потенцијал (E_x) нижи од - 100 мV.

У анаеробној студији, процена минерализације укључује мерење угљен диоксида и метана.

Део трећи

ПРИМЕР ГАС – ПРОТОЧНЕ АПАРАТУРЕ

Део четврти

ПРИМЕР БИОМЕТАРСКОГ АПАРАТА

Део пети
ПРИМЕР РАЧУНАЊА ЗА ПРИМЕНУ ДОЗЕ НА ПОСУДЕ ЗА ИСПИТИВАЊЕ

Унутрашњи промер цилиндра: 8 cm

Дубина колоне са водом не укључујући седимент: 12 cm

Површина: 3,142 × 42 = 50,3 cm^2

Доза која се препоручује за примену:

500 g испитиване субстанце/ha одговара 5 µg/cm^2

Укупно µg: 5 × 50,3 = 251,5 µg

Подесити количину у односу на дубину од 100 cm:

12 × 251,5 ÷ 100 = 30,18 µg

Запремина колоне са водом: 50,3 × 12 = 603 ml

Концентрација у води: 30,18 ÷ 603= 0,050 µg/ml или 50 µg/l

C.25. АЕРОБНА МИНЕРАЛИЗАЦИЈА У ПОВРШИНСКИМ ВОДАМА – ИСПИТИВАЊЕ БИОРАЗГРАДЊЕ У СИМУЛАЦИОНИМ УСЛОВИМА

Део први

1. МЕТОДА ИСПИТИВАЊА

Ова метода заснива се на Упутству за испитивање OECD 309 (2004)[1].

1.1. УВОД

Сврха овог испитивања је да се одреди време потребно за биоразградњу испитиване супстанце која је присутна у аеробним природним водама у ниској концентрацији и квантификује кинетичка брзина. Ово симулационо испитивање представља шаржни поступак који се изводи у лабораторијским условима у судовима на тресилици чиме се одређује брзина биоразградње органске супстанце у аеробним условима у узорцима природних површинских вода (слатка, бракична или морска). Заснива се на стандарду ISO 14592-1[2] а садржи и елементе метода испитивања C.23. и C.24.[3,4]. У случају дужег трајања испитивања, поступак се може допунити периодичним додавањем воде (полуконтинуални поступак) како се не би нарушио испитивани микросистем. Главни циљ симулационог испитивања је одређивање минерализације испитиване супстанце у површинским водама, која чини основу за одређивање кинетике разградње. Испитивање има и факултативни секундарни циљ – добијање информација о примарној разградњи и формирању главних производа разградње. Утврђивање производа трансформације и, ако је могуће, квантификовање њихових концентрација је нарочито важно за супстанце које се врло споро минерализују (нпр. где време полуживота укупног преосталог ^{14}C износи више од 60 дана). Због аналитичких ограничења, за идентификацију и квантификацију значајних производа трансформације по правилу користити више концентрације испитиване супстанце (нпр. > 100 µg/l).

У оквиру овог испитивања ниска концентрација подразумева концентрацију довољно ниску (нпр. мање од 1 µg/l до 100 µg/l) да се приликом испитивања постигне кинетика биоразградње каква се може очекивати у животној средини. У поређењу са укупном количином биоразградљивих једињења угљеника у природним водама која се користи у испитивању, ниска концентрација испитиване супстанце ће служити као секундарни супстрат. То значи да је очекивана кинетика биоразградње кинетика првог реда (кинетика „без раста”) и да се испитивана супстанца може разградити „кометаболизмом”. Кинетика првог реда подразумева да је брзина разградње (mg/l/дан) сразмерна концентрацији супстрата, која опада са временом. Код праве кинетике првог реда константа специфичне брзине разградње (k) је независна од времена и концентрације. Према томе, k се не мења значајније током једног експеримента, али ни са повећањем концентрације између експеримената. Према дефиницији, константа специфичне брзине разградње једнака је релативној промени концентрације по јединици времена: $k = (1/C) \times (dC/dt)$. Иако се у прописаним условима у правилу очекује кинетика првог реда, у одређеним околностима могу више одговарати друге врсте кинетике. Одступања од кинетике првог реда могу се запазити кад брзину биоразградње више ограничава појава преноса масе, нпр. брзина дифузије, него брзина биолошке реакције. Подаци се готово увек могу описати кинетиком псеудопрвог реда, ако се прихвати константа брзине која зависи од концентрације.

Информације о биоразградљивости испитиване супстанце при вишим концентрацијама (нпр. из стандардних брзих скрининг тестова) као и подаци о абиотичкој разградљивости, производима трансформације и релевантним физичко-хемијским својствима, потребно је да буду на располагању пре испитивања да помогну планирању експеримента и тумачењу резултата. Способност потпуне биоразградње може се одредити применом ^{14}C обележене испитиване супстанце и одређивањем фазне расподеле ^{14}C на крају испитивања. Ако се користи необележена испитивана супстанца, коначна биоразградња се може проценити само ако се испитује виша концентрација и ако су познати сви главни производи разградње.

1.2. ДЕФИНИЦИЈЕ

Примарна биоразградња јесте промена структуре (трансформација) хемијске супстанце деловањем микроорганизама која доводи до губитка идентитета хемикалије.

Функционална биоразградња јесте промена структуре (трансформација) хемијске супстанце деловањем микроорганизама која доводи до губитка одређеног својства.

Потпуна аеробна биоразградња јесте разградња хемијске супстанце деловањем микроорганизама у присуству кисеоника на угљен-диоксид, воду и минералне соли других присутних елемената (минерализација) и стварање нове биомасе и органских производа микробиолошке биосинтезе.

Минерализација јесте разградња хемијске супстанце односно органског садржаја деловањем микроорганизама у присуству кисеоника на угљен-диоксид, воду и минералне соли других присутних елемената.

Фаза прилагођавања (lag фаза) јесте време од почетка испитивања које је потребно да се микроорганизми који врше разградњу прилагоде и да степен биоразградње хемијске супстанце односно органског садржаја достигне ниво детекције (нпр. 10% максималне теоретске биоразградње или мање, зависно од тачности мерне технике).

Максимална биоразградња јесте степен биоразградње хемијске супстанце односно органског садржаја у оквиру испитивања, изражен у процентима, изнад којег више нема биоразградње током испитивања.

Примарни супстрат јесте скуп органски везаног угљеника и извора енергије који обезбеђују раст и одржавање биомасе микроорганизама.

Секундарни супстрат јесте компонента супстрата која је присутна у тако ниској концентрацији да њеном разградњом релевантни микроорганизми примају тек незнатне количине угљеника и енергије у односу на угљеник и енергију која се обезбеђује разградњом главних компонената супстрата (примарни супстрати).

Константа брзине разградње јесте константа брзине кинетике првог реда или псеудопрвог реда k (d^{-1}), којом се означава брзина процеса разградње. У случају шаржних експеримената k се процењује из почетног дела криве разградње добијене по завршетку фазе прилагођавања.

Време полуживота, $t_{1/2}$ (d) јесте израз који се користи за описивање брзине реакције првог реда. То је временски интервал који одговара смањењу концентрације за фактор 2. Однос између времена полуживота и константе брзине разградње описан је једначином $t_{1/2} = \ln 2/k$.

Време полуразградње, DT_{50} (d) јесте израз који се користи за квантификацију резултата испитивања биоразаградње. То је време које је потребно да се достигне 50% биоразградње, укључујући фазу прилагођавања.

Граница детекције (Limit of detection, у даљем тексту: LOD) јесте концентрација супстанце испод које се супстанца више не може разликовати од аналитичких артефаката.

Граница квантификације (Limit of quantification, у даљем тексту: LOQ) јесте концентрација супстанце испод које се концентрација не може одредити са прихватљивом тачношћу.

Растворени органски угљеник (у даљем тексту: DOC) јесте део органски везаног угљеника у узорку воде који се не може уклонити предвиђеним раздвајањем фаза, нпр. 15-минутним центрифугирањем на 40 000 ms^{-2} или мембранском филтрацијом помоћу мембрана величине пора 0,2 µm до 0,45 µm.

Укупна ^{14}C активност органског угљеника (Total organic ^{14}C activity, у даљем тексту: TOA) јесте укупна ^{14}C активност која потиче од органски везаног угљеника.

^{14}C активност растворeног органског угљеника (Dissolved organic ^{14}C activity, у даљем тексту: DOA) јесте укупна ^{14}C активност која потиче од растворeног органски везаног угљеника.

^{14}C активност органског угљеника у чврстом облику (Particulate organic ^{14}C activity, у даљем тексту: POA) јесте укупна ^{14}C активност која потиче од органски везаног угљеника у чврстом облику.

1.3. ПРИМЕНЉИВОСТ ИСПИТИВАЊА

Симулационо испитивање је примењиво у случају неиспарљивих и благо испарљивих органских супстанци које се испитују при ниским концентрацијама. Ако се користе судови са разменом ваздуха из атмосфере (нпр. затворени чепом од вате), супстанце са Хенријевом константом испод око 1 $Pa \cdot m^3/mol$ (око 10-5 $atm \cdot m^3/mol$) могу се у пракси сматрати неиспарљивима. Ако се користе затворени судови за анализу супстанце из гасне фазе (headspace), могу се испитивати и слабо испарљиве супстанце (са Хенријевом константом < 100 Pa m^3/mol или < 1 0^{-3} $atm \cdot m^3/mol$) без губитака масе из испитиваног система. При ослобађању CO^2 може доћи до губитака ^{14}C обележене супстанце ако се не спроведу одговарајуће мере предострожности. У таквим ситуацијама понекад је потребно одвајати CO_2 на унутрашњем апсорберу са базама или користити спољни апсорбер систем CO_2 (директно одређивање $^{14}CO_2$; видети Додатак трећи ове методе). За одређивање кинетике биоразградње, концентрације испитиване супстанце су испод растворљивости у води. Ипак, имати на уму да вредности растворљивости у води које се наводе у литератури могу бити знатно више од растворљивости испитиване супстанце у природним водама. Растворљивости испитиваних супстанци које су изразито слабо растворљиве у води могу се утврдити и помоћу природних вода које се испитују.

Метода се може користити за симулацију биоразградње у површинским водама без крупних честица (пелагички тест) или у мутним површинским водама каква се нпр. може наћи у близини међупростора вода/седимент (испитивање са суспендованим седиментом).

1.4. ПРИНЦИП ИСПИТИВАЊА

Испитивање се спроводи у шаржама инкубирањем испитиване супстанце било само са површинском водом (пелагички тест) или са површинском водом којој је додата суспендована чврста супстанца/седимент у концентрацији од 0,01 g/l до 1 g/l суве масе (испитивањем са суспендованим седиментом) ради симулације водене средине са суспендованим чврстим супстанцама или ресуспендованим седиментом. Концентрација суспендоване чврсте супстанце/седимента у доњем опсегу овог интервала типична је за већину површинских вода. Судови са испитиваним узорком се инкубирају у мраку на собној температури у аеробним условима, уз мућкање. За одређивање кинетике разградње користе се најмање две концентрације испитиване супстанце. Концентрације се разликују за фактор 5 до 10 и представљају очекивани опсег концентрација у животној средини. Максимална концентрација испитиване супстанце не сме бити виша од 100 µg/l, а пожељно је да максималне испитиване концентрације буду од 10 µg/l или ниже како би се обезбедило да биоразградња буде у складу са кинетиком првог реда. Најнижа концентрација не сме бити виша од 10 µg/l, а предност дати концентрацијама 1 µg/l до 2 µg/l или мање од 1 µg/l. Обично се тако ниске концентрације могу довољно добро анализирати употребом ^{14}C обележених супстанци које су доступне на тржишту. Ако се испитивана супстанца примењује у концентрацији ≤ 100 µg/L, концентрацију често није могуће измерити са потребном тачношћу због аналитичких ограничења (видети одељак 1.7.2. ове методе). Више концентрације испитиване супстанце (> 100 µg/L, а понекад и > 1 mg/L) могу се користити за идентификацију и квантификацију главних производа трансформације и у случајевима кад није расположива специфична аналитичка метода са ниском границом детекције. Ако се испитују високе концентрације испитиване супстанце, понекад није могуће одредити константу брзине разградње првог реда и време полуживота на основу добијених резултата будући да разградња вероватно неће следити кинетику првог реда.

Разградња се прати у одговарајућим временским размацима, мерењем преосталог ^{14}C или преостале концентрације испитиване супстанце, ако се врши специфична хемијска анализа. ^{14}C обележавањем најстабилнијег дела молекула може се одредити укупна минерализација, док се ^{14}C обележавањем мање стабилног дела молекула и применом специфичне анализе може одредити само примарна биоразградња. Међутим, најстабилнији део не укључује обавезно релевантни функционални део молекула (који је повезан са специфичним својством, као што су токсичност, биоакумулација итд). У том случају, код испитивања је можда примеренije користити испитивану супстанцу ^{14}C обележену у функционалном делу да би се пратио губитак специфичног својства.

1.5. ИНФОРМАЦИЈЕ О ИСПИТИВАНОЈ СУПСТАНЦИ

За ово испитивање могу се користити и радиоактивно обележене и необележене испитиване супстанце. Препоручује се

^{14}C техника обележавања, и по правилу се налази на најстабилнијем делу или деловима молекула (видети и одељак 1.4. ове методе). Код супстанци које садрже више од једног ароматичног прстена по могућству ^{14}C обележити један или више угљеника у сваком прстену. Осим тога, пожељно је ^{14}C обележити један или више угљеника са обе стране лако разградљивих веза. Хемијска и/или радиоактивна чистоћа испитиване супстанце је > 95%. Код радиоактивно обележених супстанци, пожељна је специфична активност од око 50 µCi/mg (1,85 MBq) или више, како би се олакшала мерења ^{14}C код испитивања са ниским почетним концентрацијама. Потребне су следеће информације о испитиваној супстанци:

– растворљивост у води (метода А.6. која је дата у овом правилнику),

– растворљивост у органском растварачу или растварачима (ако се супстанца примењује помоћу растварача или има ниску растворљивост у води),

– константа дисоцијације (pKa), ако је супстанца подложна протонизацији или депротонизацији (Упутство за испитивање OECD TG 112)[5],

– напон паре (метода А.4. која је дата у овом правилнику) и Хенријева константа,

– хемијска стабилност у води и у мраку (хидролиза) (метода С.7. која је дата у овом правилнику).

Ако се супстанце које су слабо растворљиве у води испитују у морској води, корисно је знати константу исољавања (или „Сеченову константу") K^s, која се дефинише изразом: $\log (S/S') = K^s C_m$, где су S и S' растворљивости супстанце у слаткој, односно морској води, а C_m је моларна концентрација соли.

Ако се испитивање обавља као испитивање са суспендованим седиментом, доступне су и следеће информације:

– коефицијент расподеле – октанол/вода (метода А.8. која је дата у овом правилнику),

– коефицијент адсорпције (метода С.18. која је дата у овом правилнику).

Остале корисне информације могу да обухватају:

– концентрација у животној средини, ако је позната или процењена,

– токсичност испитиване супстанце за микроорганизме (метода С.11. која је дата у овом правилнику),

– лака и/или инхерентна биоразградљивост (методе С.4 A-F, С.12. и С.9. које су дате у овом правилнику, Упутство за испитивање OECD TG 302[5]),

– аеробна или анаеробна биоразградљивост у земљишту и студије трансформације у системима вода-седимент (методе С.23. и С.24. које су дате у овом правилнику).

1.6. РЕФЕРЕНТНА СУПСТАНЦА

Као референтну супстанцу користити супстанцу која се по правилу лако разграђује у аеробним условима (нпр. анилин или натријум бензоат). Очекивано време разградње анилина и натријум бензоата обично је краће од 2 недеље. Сврха коришћења референтних супстанци је да се провери се да ли се микробиолошка активност у испитиваној води креће унутар одређених граница, тј. да ли вода садржи активну микробиолошку популацију.

1.7. КРИТЕРИЈУМИ КВАЛИТЕТА

1.7.1. Ефикасност примењене аналитичке технике

Сваку почетну концентрацију проверити одмах након додавања испитиване супстанце у најмање два понављања мерењем ^{14}C активности или, у случају необележених супстанци, хемијском анализом. Тиме се добијају информације о примењивости и поновљивости аналитичке методе и хомогености расподеле испитиване супстанце. Код каснијих анализа података обично се не користи номинална концентрација већ измерена почетна ^{14}C активност односно измерена концентрација испитиване супстанце, јер се тиме исправљају губици услед сорпције и грешке у дозирању. Код ^{14}C обележене супстанце ефикасност на крају експеримента произлази из биланса масе (видети одељак 1.8.9.4. ове методе). У идеалном случају биланс масе радиоактивно обележене супстанце креће се у опсегу од 90% до 110% док аналитичка тачност код необележених испитиваних супстанци је таква да се добије почетна ефикасност у опсегу од 70% до 110%. Ове опсеге схватити као циљне вредности, а не као критеријум за прихватање испитивања. Аналитичка тачност се може опционо одредити при концентрацији испитиване супстанце која је нижа од почетне као и за главне производе трансформације.

1.7.2. Поновљивост и осетљивост аналитичке методе

Поновљивост аналитичке методе (укључујући ефикасност почетне екстракције) за квантификацију испитиване супстанце и производа трансформације (према потреби) проверити анализом појединачних екстраката површинске воде у пет понављања.

Граница детекције (LOD) аналитичке методе за испитивану супстанцу и производе трансформације по могућству је најмање 1% од почетне количине која је примењена на систем за испитивање. Граница квантификације (LOQ) је једнака или мања од 10% од примењене концентрације. За хемијске анализе многих органских супстанци и њихових производа трансформације често су потребне релативно високе концентрације испитиване супстанце тј. > 100 µg/L.

1.8. ОПИС МЕТОДЕ ИСПИТИВАЊА

1.8.1. Опрема

Испитивање се може обавити у ерленмајерима или боцама одговарајуће запремине (нпр. 0,5 литар или 1,0 литар) затвореним силиконским или гуменим чеповима или у серумским боцама са затварачима који не пропуштају CO_2 (нпр. са затварачем од бутилне гуме). Друга могућност је да се испитивање спроведе тако што се употреби већи број судова и узима се читав садржај суда за анализу, најмање два понављања за сваки интервал узорковања (видети одељак 1.8.9.1. ове методе). Код неиспарљивих испитиваних супстанци које нису радиоактивно обележене нису потребни чепови или затварачи који не пропуштају гас; довољно их је затворити ватом која спречава загађење из ваздуха (видети одељак 1.8.9.1. ове методе). Благо испарљиве супстанце испитати у систему биометарског типа уз благо мешање водене површине. Да би се избегло загађење бактеријама, судови се могу пре употребе стерилисати сувом стерилизацијом или паром у аутоклаву. Осим тога, користи се следећа стандардна лабораторијска опрема:

– тресилица или магнетне мешалице за непрекидно мућкање судова са узорцима,

– центрифуга,

– pH-метар,

– турбидиметар за нефелометријска мерења замућености,

– пећ за жарење или микроталасна пећ за припрему узорка за одређивање суве супстанце,

– систем за мембранску филтрацију,

– аутоклав или суви стерилизатор за термичку стерилизацију стаклене опреме,

– опрема за руковање ^{14}C обележеним супстанцама,

– опрема за квантификацију ^{14}C активности у узорцима из раствора за издвајање CO_2 и, по потреби, из узорака седимента,

– аналитичка опрема за одређивање испитиване (и референтне) супстанце, ако се користи специфична хемијска анализа (нпр. гасни хроматограф, течни хроматограф под високим притиском).

1.8.2. Радни раствори испитиване супстанце

За припрему радних раствора испитиваних и референтних супстанци користити дејонизовану воду (видети одељак 1.8.7. ове методе). У дејонизованој води не сме бити супстанци које би могле бити токсичне за микроорганизме, а удео растворeног органског угљеника (DOC) не сме бити виши од 1 mg/L[6].

1.8.3. Узорковање и транспорт узорака површинских вода

Место за узорковање површинских вода одабрати у складу са сврхом испитивања у свакој датој ситуацији. Код избора места за узорковање узети у обзир могућу историју уноса материјала из пољопривреде, индустрије и домаћинстава. Вода за испитивање не сме се скупљати на местима за која се зна да су у претходне четири године била загађена испитиваном супстанцом или њеним структурним аналозима, осим ако је сврха истраживања да се испита брзина разградње на загађеним локацијама. На месту узорковања измерити pH вредност и температуру воде. Поред тога, забележити дубину узорковања и изглед воденог узорка (нпр. боја и мутноћа) (видети одељак 3. ове методе). Да би се доказали аеробни услови, измерити концентрацију кисеоника и/или редокс потенцијал у води и површинском слоју седимента, осим ако је то очигледно у односу на изглед и ранија искуства са овом локацијом. Површинску воду превозити у темељно очишћеним боцама. За време транспорта, температура узорка не сме бити значајно виша од температуре испитивања. Ако транспорт траје више од 2 до 3 сата, препоручује се хлађење на 4 °C.

1.8.4. Складиштење и припрема узорака површинске воде

Испитивање по могућству започети у року од једног дана од узимања узорка. Складиштење воде, ако је потребно, свести на најмању могућу меру, а у сваком случају не сме да траје дуже од 4 недеље. Водени узорак до употребе држати на температури од 4° C, уз проветравање. Пре употребе уклонити крупне честице нпр. филтрирањем кроз филтер величине пора од 100 µm кроз груби филтер-папир или таложењем.

1.8.5. Припрема воде са седиментом (опционо)

Код испитивања са суспендованим седиментом, површински седимент се додаје у узорке које садрже природну воду (која је претходно филтрирана ради уклањања крупних честица, како је описано у одељку 1.8.4. ове методе) да се добије суспензија при чему је концентрација суспендоване чврсте супстанце између 0,01 и 1 g/L. Површински седимент потиче са истог места као и водени узорак. Зависно од конкретне водене средине, површински седимент може имати висок садржај органског угљеника (2,5% до 7,5%) и фину текстуру или низак садржај органског угљеника (0,5% до 2,5%) и грубу текстуру[3]. Површински седимент се може припремити на следећи начин: уз помоћ провидне пластичне цевчице извуче се неколико седиментних језгара; одмах након узорковања одстране се горњи аеробни слојеви (од површине до дубине од највише 5 mm) и саставе. Добијени узорак седимента се транспортује у суду са великим ваздушним простором како би се осигурали аеробни услови (уз хлађење на 4 °C ако превоз траје више од 2 односно 3 сата). Узорак седимента се суспендује у узорку испитиване воде у размери 1:10 и држи до употребе на температури од 4 °C уз проветравање. Складиштење седимента, ако је оно потребно, свести на најмању могућу меру, а у сваком случају не сме да траје дуже од 4 недеље.

1.8.6. Полуконтинуирани поступак (опционо)

Инкубацију је понекад потребно продужити (на неколико месеци) ако се значајна разградња испитиване супстанце измери тек након дугог времена прилагођавања. Ако је то познато из ранијег испитивања супстанце, испитивање се може започети полуконтинуираним поступком, који омогућава периодично обнављање дела узорка испитиване воде односно суспензије (видети Додатак други ове методе). Друга могућност је да се уобичајено шаржно испитивање претвори у полуконтинуирано ако током приближно 60 дана испитивања шаржним поступком није дошло до разградње испитиване супстанце (видети одељак 1.8.8.3. ове методе).

1.8.7. Додавање испитиване (или референтне) супстанце

Када су у питању супстанце високе растворљивости у води (> 1 mg/L) и ниске испарљивости (Хенријева константа < 1 $Pa \cdot m^3/mol$ или < 10^{-5} $atm \cdot m^3/mol$) може се припремити радни раствор у дејонизованој води (видети одељак 1.8.2. ове методе); у узорке за испитивање се дода одговарајућа запремина радног раствора да би се добила жељена концентрација. Запремину сваког додатог радног раствора који се додаје у посуду свести на најмању могућу меру (по могућству < 10% коначне запремине течности). Друга могућност је да се испитивана супстанца раствори у већој запремини испитиване воде, што се може сматрати заменом за коришћење органских растварача.

Ако код припреме радних раствора неиспарљивих супстанци које су слабо растворљиве у води није могуће избећи примену растварача, користити испарљиве органске растваваче, с тим да количина растварача која се уноси у систем за испитивање не сме бити виша од 1% v/v и не сме имати штетне ефекте по микробиолошку активност. Растварач не сме утицати на стабилност испитиване супстанце у води. Растварач се одстрани до најмање могуће количине како не би дошло до значајног повећања концентрације DOC у испитиваној води, односно суспензији. Ово проверити специфичном анализом супстанци односно, уколико је то могуће, анализом DOC[6]. Треба водити рачуна да се пренета количина растварача сведе на најмању неопходну меру и уверити се да се присутна количина испитиване супстанце може растворити у коначној запремини испитиване воде. Могу се користити и друге технике за увођење испитиване супстанце у узорке[7,8]. Ако се за увођење испитиване супстанце користи органски растварач, увести контроле са растварачем које садрже испитивану воду (без других додатака) и испитивану воду са референтном супстанцом и са њима поступати на сличан начин као са активним узорцима за испитивање у које је додата испитивана супстанца у растварачу. Сврха контрола са растварачем је да се испитају могући штетни утицаји растварача на микробиолошку популацију на основу разградње референтне супстанце.

1.8.8. Услови испитивања

1.8.8.1. Температура испитивања

Инкубација се спроводи у мраку (пожељно) или под дифузном расветом на контролисаној температури (± 2° C), која може да одговара температури на терену или стандардној температури од 20° C до 25° C. Температура на терену може бити стварна температура узорка у тренутку узорковања или просечна температура на месту узорковања.

1.8.8.2. Мућкање

Честице и микроорганизме држати у суспензији непрекидним мућкањем тј трешењем или мешањем. Мућкањем се олакшава и пренос кисеоника из ваздушног простора у течност и тако обезбеђују потребни аеробни услови. Судови се ставе на тресилицу (око 100 о/мин) или се користи магнетна мешалица. Трешење односно мешање је што је могуће блаже, али истовремено водити рачуна да се одржи хомогеност суспензије.

1.8.8.3. Трајање испитивања

Испитивање углавном не сме да траје дуже од 60 дана, осим ако се примењује полуконтинуирани поступак са периодичним обнављањем испитиване суспензије (видети одељак 1.8.6. и Додатак други ове методе). Међутим, време испитивања се и код примене шаржног поступка може продужити до највише 90 дана уколико је разградња испитиване супстанце започела у првих 60 дана. Разградња се прати у одговарајућим временским размацима одређивањем преостале ^{14}C активности односно насталог $^{14}CO_2$ (видети одељак 1.8.9.4. ове методе) и/или хемијском анализом (видети одељак 1.8.9.5. ове методе). Време инкубације је довољно дуго да би се проценио процес разградње. Пожељно је да степен разградње буде виши од 50%; код супстанци које се споро разграђују степен разградње је довољан (по правилу изнад 20%) да се може проценити константа кинетичке брзине разградње.

Врше се периодична мерења pH вредности и концентрације кисеоника у испитиваном систему, осим ако захваљујући ранијим искуствима са узорцима воде и седимента са исте локације у сличним испитивањима таква мерења нису потребна. У одређеним условима услед метаболизма примарних супстрата, који могу бити присутни у води или седименту у знатно вишим концентрацијама, може доћи до стварања повећаних количина CO_2 и повећане потрошње кисеоника, што може изазвати значајне промене експерименталних услова током испитивања.

1.8.9. Поступак

1.8.9.1. Припрема узорака за пелагички тест

У судове за испитивање се пренесе одговарајућа количина испитиване воде, до око једне трећине запремине суда, али не мање од око 100 ml. И ако се користи већи број судова (како би се у сваком времену узорковања могао узимати читав садржај из суда), потребно је око 100 ml испитиване воде, будући да мале количине узорка могу утицати на дужину фазе прилагођавања. Испитивана супстанца се додаје из радног раствора како је описано у одељку 1.8.2. и 1.8.7. ове методе. Да би се одредила кинетика разградње и израчунала константа кинетичке брзине разградње, потребне су најмање две различите концентрације испитиване супстанце које се разликују за фактор 5 до 10. Обе изабране концентрације мање су од 100 µg/L, а пожељно је да буду у опсегу од < 1 µg/ L до 10 µg/L.

Судови се затворе чеповима или поклопцима који не пропуштају ваздух и CO_2. Ако се испитују неиспарљиве хемикалије

које нису радиоактивно обележене, посуде се могу зачепити ватом, која спречава загађење из ваздуха (видети одељак 1.8.1. ове методе), под условом да се зна да су сви важнији производи разградње неиспарљиви и да се примењује индиректно одређивање CO_2 (видети Додатак трећи ове методе).

Судови се инкубирају на одабраној температури (видети одељак 1.8.8.1. ове методе). Узорци се узимају за хемијску анализу или мерење ^{14}C на почетку испитивања (тј. пре него што започне разградња; видети одељак 1.7.1. ове методе) и у одговарајућим временским размацима током испитивања. Узорковање се може обавити извлачењем подузорака (нпр. аликвота од 5 ml) из сваког понављања или узимањем читавог садржаја суда у сваком времену узорковања. Минерализација испитиване супстанце може се одредити индиректно или директно (видети Додатак трећи ове методе). Обично је за поуздано одређивање константе брзине потребно најмање пет тачака узорковања у фази разградње (тј. након завршетка фазе прилагођавања), осим у случају брзо разградљивих супстанци, када се уз одговарајуће образложење могу допустити и три тачке узорковања. Код супстанци које нису брзо разградљиве у фази разградње се без проблема може обавити више мерења и стога за процену *k* користити више тачака података. Није могуће навести тачан временски распоред узорковања будући да су брзине биоразградње различите; ипак, препоручује се да се у случају споре разградње узорковање врши једанпут недељно. Ако се испитивана супстанца брзо разграђује, узорковање обављати једанпут дневно у прва три дана, а затим сваки други или трећи дан. У одређеним околностима, нпр. у случају супстанци које врло брзо хидролизују, понекад је потребно узимати узорке на сваких сат времена. Препоручује се да се пре испитивања обави прелиминарна проба како би се одредили одговарајући интервали узорковања. Ако се узорци чувају за даљу специфичну анализу, препоручљиво је да се узме више узорака и затим на крају експеримента изаберу они који ће се анализирати обрнутим редоследом тј. прво се анализирају узорци који су узети последњи (за смернице о стабилности узорака током складиштења видети одељак 1.8. ове методе).

1.8.9.2. Број судова и узорака

Припреми се довољан број судова за испитивање тако да се добију:

– судови за испитивање; најмање два суда (тј. два понављања) за сваку концентрацију испитиване супстанце (пожељно је три суда тј. три понављања) или већи број судова за испитивање за сваку испитивану концентрацију, ако се у сваком времену узорковања узима читав садржај суда (означени као F_T);

– судови за израчунавање биланса масе; најмање два суда за сваку испитивану концентрацију (означене као F_M);

– слепа проба, без испитиване супстанце; најмање један суд за слепу пробу која садржи само воду за испитивање (означена као F_B);

– контрола са референтном супстанцом; два суда са референтном супстанцом (нпр. анилин или натријум бензоат, 10 µg/l) (означене као F_C). Сврха контроле са референтном супстанцом је да се потврди минимална микробиолошка активност. Ако је практично, може се користити радиоактивно обележена референтна супстанца и онда када се разградња испитиване супстанце прати хемијским анализама;

– стерилна контрола; један или два суда које садрже стерилизовану воду за испитивање ради провере могуће абиотичке разградње или другог небиолошког уклањања испитиване супстанце (означене као F_S). Биолошка активност се може прекинути стерилизацијом узорка у аутоклаву (121° C; 20 мин), додавањем токсичне супстанце (нпр. натријум-азид (NaN_3) у концентрацији 10 g/l до 20 g/l, жива-(II) хлорид ($HgCl_2$) у концентрацији 100 mg/l или формалин у концентрацији 100 mg/l) или гама зрачењем. Ако се користи $HgCl_2$ он се збрињава као токсични отпад. У води у којој је додата велика количина седимента није лако постићи стерилне услове; у том случају препоручује се поновљена стерилизација у аутоклаву (нпр. три пута). Узети у обзир да се адсорпциона својства седимента могу променити стерилизацијом у аутоклаву;

– контроле са растварачем, које садрже воду за испитивање и воду за испитивање са референтном супстанцом; по два суда која су обрађена истом количином растварача уз примену истог поступка као у случају испитиване супстанце. Сврха ове контроле је да се испитају могући штетни ефекти растварача код одређивања разградње референтне супстанце.

Код планирања испитивања узети у обзир релативну важност повећаног броја понављања у односу на повећани број узорковања. Тачан број судова зависи од методе мерења разградње (видети одељак 1.8.9.1, одељак 1.8.9.4. и Додатак трећи ове методе).

У сваком времену узорковања из сваког испитиваног суда узети по два подузорка (нпр. аликвоте од 5 ml). Ако се користи већи број судова ради узорковања читавог садржаја суда у сваком времену узорковања узети најмање два суда (видети одељак 1.8.9.1. ове методе).

1.8.9.3. Припрема судова за испитивање са суспендованим седиментом (опционо)

У судове за испитивање додају се потребне запремине воде за испитивање и седимента (по потреби видети одељак 1.8.5. ове методе). Припрема судова за испитивање са суспендованим седиментом је иста као код пелагичког теста (видети одељак 1.8.9.1. и 1.8.9.2. ове методе). Пожељно је користити серумске боце или судове сличног облика. Затворени судови се полажу водоравно на тресилицу. Наравно, отворене судове за неиспарљиве супстанце које нису радиоактивно обележене ставити у усправан положај; у овом случају препоручује се употреба магнетне мешалице са магнетима обложеним стаклом. Боце према потреби проветравати како би се одржали потребни аеробни услови.

1.8.9.4. Радиохемијска одређивања

Добијени $^{14}CO_2$ се мери индиректно и директно (видети Додатак трећи ове методе). Индиректно одређивање $^{14}CO_2$ се заснива на разлици између почетне активности ^{14}C у води за испитивање односно суспензији и укупне преостале активности у

времену узорковања, која се мери након закисељавања узорка на pH 2-3 и излучивања CO_2. Тиме је неорганski угљеник уклоњен и преостала измерена активност потиче од органског материјала. Индиректно одређивање $^{14}CO_2$ не користити ако трансформацијом испитиване супстанце настају испарљиве супстанце као главни производи (видети Додатак трећи ове методе). $^{14}CO_2$ по могућству мерити директно (видети Додатак трећи ове методе) у најмање једном од понављања у сваком времену узорковања. Овај поступак омогућава да се провери и биланс масе и процес биоразградње, али је ограничен на испитивања која се врше са затвореним судовима.

Ако се добијени $^{14}CO_2$ мери директно током испитивања, на почетку испитивања припремити већи број судова. Директно одређивање $^{14}CO_2$ препоручује се ако се трансформацијом испитиване супстанце добијају испарљиве супстанце као главни производи. Додатни судови за испитивање се у свакој тачки мерења закиселе на pH 2-3 и $^{14}CO_2$ се скупља на унутрашњем или спољном апсорберу (видети Додатак трећи ове методе).

Концентрације ^{14}C обележене испитиване супстанце и главни производи трансформације могу се опционо одредити применом радиохроматографије (нпр. танкослојна хроматографија, RAD-TLC) или HPLC са радиохемијском детекцијом.

Исто тако може се одредити фазна расподела преостале радиоактивности (видети Додатак први) и преостала испитивана супстанца и производи трансформације.

На крају испитивања одредити биланс масе директним мерењем $^{14}CO_2$ у посебним судовима за испитивање из којих се не узимају узорци током испитивања (видети Додатак трећи ове методе).

1.8.9.5. Специфична хемијска анализа

Ако је расположива осетљива метода за специфичну хемијску анализу, примарна биоразградња се може одредити мерењем укупне преостале концентрације испитиване супстанце уместо употребе техника радиоактивног обележавања. Ако се користи радиоактивно обележена испитивана супстанца (за мерење укупне минерализације), специфична хемијска анализа се може вршити паралелно како би се добиле додатне информације и проверио поступак. Осим тога, специфичном хемијском анализом могу се мерити производи трансформације настали разградњом испитиване супстанце, а то се у сваком случају препоручује у случају супстанци које се минерализују са временом полуживота преко 60 дана. У сваком времену узорковања измерити и документовати концентрацију испитиване супстанце и производе трансформације (као концентрацију и као проценат од примењене концентрације). По правилу, у сваком времену узорковања потребно је идентификовати производе трансформације који су одређени на нивоу од 10% од примењене концентрације, осим ако постоје оправдани разлози да се то не учини. Такође размислити о идентификацији производа конверзије чије се концентрације стално повећавају током истраживања, чак и ако њихове концентрације не прелазе горе споменути праг, јер то може указивати на отпорност. Ако се сматра да би могло доћи до брзе абиотичке трансформације испитиване супстанце (нпр. хидролиза), размислити о анализирању производа трансформације у стерилним контролама. Потребу квантификације и идентификације производа трансформације размотрити за сваки случај посебно и у извештају навести одговарајуће образложење. Поступци екстракције органским растварачем примењују се у складу са упутствима датим у одговарајућој аналитичкој методи.

Све узорке складиштити на температури од 2° C до 4° C без приступа ваздуха, ако ће се анализа обавити у року од 24 сата (пожељно). За дуже складиштење узорке замрзнути испод – 18° C или хемијски конзервисати. Конзервисање узорака закишељавањем се не препоручује јер закишељени узорци могу бити нестабилни. Ако се узорци неће анализирати у року од 24 сата и потребно их је дуже складиштити, спроводи се истраживање стабилности у условима складиштења како би се доказала стабилност хемикалија на температурама испод - 18°C односно у условима конзервисања. Ако аналитичка метода подразумева екстракцију растварачем или екстракцију чврсте фазе (SPE), екстракцију обавити непосредно након узорковања или након хладног складиштења у трајању од највише 24 сата.

Зависно од осетљивости аналитичке методе, понекад су потребне веће запремине узорака од оних који су наведени у одељку 1.8.1. ове методе. Испитивање се може лако обавити са запреминама од једног литра у судовима од 2 до 3 литра, што омогућава узимање узорака од око 100 ml.

2. ПОДАЦИ И ИЗВЕШТАВАЊЕ

2.1. ОБРАДА РЕЗУЛТАТА

2.1.1. Графички приказ података

Времена узорковања заокружити на цео број сати (осим ако се супстанца значајно разграђује у неколико минута или сати), али не и на цео број дана. Направи се линеарни и полулогаритамски приказ процењених вредности преостале активности испитиване супстанце (за ^{14}C обележене супстанце) односно преостале концентрације (за необележене супстанце) у зависности од времена (видети Слике 1а. и 1б. које су дате у Додатку трећем ове методе). Ако је дошло до разградње, резултати узорака F_T се упореде са резултатима узорака F_S. Ако се средње вредности резултата узорака са испитиваном супстанцом (F_T) и стерилних узорака (F_S) разликују за мање од 10%, може се претпоставити да је запажена разградња претежно абиотичка. Ако је разградња у узорцима F_S мања, добијени резултати се могу употребити за корекцију резултата узорака F_T (одузимањем) и процену степена биоразградње. Ако се врше опционе анализе значајних производа трансформације, осим графичког приказа опадања испитиване супстанце приказати формирање и опадање производа трансформације.

Трајање фазе прилагођавања t_L процени се из криве разградње (полулогаритамски приказ) екстраполацијом линеарног дела криве до нулте разградње или, као друга могућност, одређивањем времена које је потребно да се постигне приближно 10% разградње (видети Слике 1а. и 1б). Из полулогаритамског графика процени се константа брзине првог реда, k, и њена стандардна грешка линеарном регресијом ln (преостала активност ^{14}C или концентрација испитиване супстанце) у зависности од времена. Посебно кад су у питању ^{14}C мерења користити само податке из почетног линеарног дела криве по завршетку

фазе прилагођавања; при том бирати пре мањи број репрезентативних података него већи број несигурних података. У овом смислу несигурност подразумева и грешке везане за препоручено директно коришћење измерених вредности преостале ^{14}C активности (видети у даљем тексту). Понекад може бити релевантно да се израчунају две различите константе брзине ако се разградња одвија у две фазе. За то је потребно дефинисати две различите фазе криве разградње. Ако се узимају узорци из истог суда, константу брзине, k, и време полуживота $t_{½} = ln2/k$ израчунати за сваки појединачни суд, док се у случају узорковања целокупног садржаја суда за израчунавање користе просечне вредности (видети последњи став одељка 1.8.9.2. ове методе). Ако се користи први поступак, константу брзине и време полуживота навести одвојено за сваки појединачни суд и као просечну вредност са стандардном грешком. Ако се користе високе концентрације испитиване супстанце, крива разградње може знатно одступати од правца (полулогаритамски график) и можда неће важити кинетика првог реда. У том случају нема смисла одређивати време полуживота. За ограничени опсег података могуће је применити кинетику псеудопрвог реда и проценити време полуразградње DT_{50} (време потребно да се постигне 50% разградње). При томе ипак имати на уму да није могуће предвидети временски ток разградње изван изабраног опсега података на основу тог DT_{50} јер се ради о вредности која описује само одређени скуп података. Рачунарски софтвери који олакшавају статистичке прорачуне и линеаризацију крива су лако доступни па се стога препоручује коришћење таквих софтвера.

Ако се врше специфичне хемијске анализе, проценити константе брзине и времена полуживота за примарну разградњу на начин како је је горе описано за укупну минерализацију. Ако је примарна разградња ограничавајући процес, понекад се могу користити тачке података из читавог тока разградње. То је стога што се овде врше директна мерења за разлику од мерења ^{14}C активности.

Ако се користе ^{14}C обележене супстанце биланс масе изразити као проценат примењене почетне концентрације бар на крају испитивања.

2.1.2. Преостала активност

Кад се део ^{14}C обележене органске супстанце биолошки разграђује, највећи део ^{14}C прелази у $^{14}CO_2$, док се други део троши на раст биомасе и/или синтезу ванћелијских метаболита. Према томе, крајња биоразградња супстанце не доводи до 100%-тног преласка њеног угљеника у $^{14}CO_2$. ^{14}C уграђен у производе биосинтезе се касније полако ослобађа као $^{14}CO_2$ услед секундарне минерализације. Из тих разлога на графичким приказима преостале активности органског ^{14}C (измерене након излучивања CO_2) односно насталог $^{14}CO_2$ у зависности од времена виде се „репови" по завршетку разградње. Ово компликује кинетичко тумачење података и стога за процену константе брзине разградње по правилу користити само почетни део криве (по завршетку фазе прилагођавања, а пре него што се постигне приближно 50% разградње). Ако се испитивана супстанца разграђује, укупна преостала активност органског ^{14}C је увек виша од активности ^{14}C повезане са преосталом непромењеном испитиваном супстанцом. Ако се испитивана супстанца разграђује реакцијом првог реда и ако се стални удео α минерализује у CO_2, почетни нагиб криве нестајања ^{14}C (укупни органски ^{14}C у времену) биће α пута нагиб одговарајуће криве за концентрацију испитиване супстанце (или тачније дела испитиване супстанце обележене са ^{14}C). Према томе, коришћењем некоригованих вредности мерења укупне активности органског ^{14}C добија се конзервативна процена константе брзине разградње. Поступци за процену концентрација испитиване супстанце из измерене радиохемијске активности на основу различитих поједностављујућих претпоставки описани су у литератури[2,9,10,11]. Такви поступци се најлакше примењују код брзо разградљивих супстанци.

2.2. ТУМАЧЕЊЕ РЕЗУЛТАТА

Ако се утврди да *k* не зависи од повећања концентрације (тј. ако је израчуната *k* вредност приближно једнака при различитим концентрацијама испитиване супстанце), може се поћи од претпоставке да је константа брзине првог реда репрезентативна за примењене услове испитивања тј. за испитивану супстанцу, водени узорак и температуру. У којој мери се резултати могу генерализовати односно екстраполисати на друге системе оценити стручном проценом. Ако се користи висока концентрација испитиване супстанце и разградња стога не следи кинетику првог реда, подаци се неће моћи користити за директну процену константе брзине првог реда односно одговарајућег времена полураспада. Међутим, подаци добијени у испитивању са високом концентрацијом испитиване супстанце могу се искористити за процену степена укупне минерализације и/или утврђивање и квантификацију производа трансформације.

Ако су познати губици у процесима различитим од биоразградње (нпр. хидролиза или испаравање), они се могу одузети од нето губитака утврђених током испитивања како би се добила приближна процена биоразградње. Подаци о хидролизи могу се добити нпр. помоћу стерилне контроле или из паралелног испитивања са вишом концентрацијом испитиване супстанце.

Индиректно и директно одређивање $^{14}CO_2$ (видети одељак 1.8.9.4. и Додатак трећи ове методе) може се користити само за мерење степена минерализације испитиване супстанце у CO_2. Радиохроматографија (RAD-TLC) и HPLC могу се користити за анализу концентрација ^{14}C обележене испитиване супстанце и формирања главних производа трансформације (видети одељак 1.8.9.4. ове методе). Директна процена времена полуживота могућа је само ако нису присутни главни производи трансформације (дефинисани као ≥ 10% примењене количине испитиване супстанце). Ако су присутни главни производи трансформације у смислу ове дефиниције, потребно је детаљно вредновање података. Ово може подразумевати поновљено испитивање и/или утврђивање производа трансформације (видети одељак 1.8.9.5. ове методе), осим ако се судбина производа трансформације може прилично добро одредити на основу искуства (нпр. информације о путањи разградње). Будући да удео угљеника из испитиване супстанце који прелази у CO_2 није увек једнак (што у великој мери зависи од концентрације испитиване супстанце и других расположивих супстрата, услова испитивања и микробиолошке заједнице), ово испитивање не омогућава директну процену потпуне биоразградње као што је то случај код испитивања опадања DOC, али је резултат сличан ономе који се добија респирометријским испитивањем. Степен минерализације ће, према томе, бити мањи или једнак минималном степену потпуне биоразградње. Да би се добила свеобухватнија слика потпуне биоразградње (минерализација и уградња у биомасу), на крају испитивања спровести анализу фазне расподеле ^{14}C (видети Додатак први

ове методе). ^{14}C у честицама састојаће се од ^{14}C уграђеног у бактеријску биомасу и ^{14}C адсорбованог на органске честице.

2.3. ВАЛИДНОСТ ИСПИТИВАЊА

Ако се референтна супстанца не разгради у очекиваном временском периоду (за анилин и натријум бензоат обично мање од две недеље), посумњати у валидност испитивања и испитивање подвргнути додатним проверама, или га поновити са новим воденим узорком. У ISO међулабораторијском испитивању ове методе у којем је учествовало седам лабораторија из разних делова Европе, прилагођене константе брзине разградње за анилин кретале су се између 0,3 и 1,7 дана$^{-1}$, просечно 0,8 дан$^{-1}$, при температури од 20° C уз стандардну грешку од ± 0,4 дана$^{-1}$ ($t_{½}$ = 0,9 дана). Уобичајена времена прилагођавања била су између 1 и 7 дана. Код вода за испитивање забележена је бактеријска биомаса 10^3 ћелија/ml до 10^4 ћелија/ml (или „colony forming units", у даљем тексту: CFU). Брзине разградње у средњеевропским водама које су богате хранљивим супстанцама биле су више него у нордијским олиготрофним водама, што може бити последица разлике у трофичком стању или ранијег излагања хемијским супстанцама.

Код радиоактивно обележених супстанци, укупна ефикасност (биланс масе) на крају експеримента износи између 90% и 110%, док код необележених супстанци почетна ефикасност је између 70% и 110%. Наведене опсеге схватити као циљне вредности и не користити их као критеријум за прихватање испитивања.

3. ИЗВЕШТАЈ О ИСПИТИВАЊУ

У извештају о испитивању јасно навести врсту испитивања које се обавља – пелагички тест или испитивање са суспендованим седиментом и најмање податке о:

1) Испитиваној супстанци и референтној супстанци:

– уобичајени називи, хемијски називи (по могућству називи IUPAC и/или CAS), CAS бројеви, структурне формуле (којима се указује на положај ^{14}C , ако се користи радиоактивно обележена супстанца) и релевантна физичко-хемијска својства испитиване и референтне супстанце (видети одељке 1.5. и 1.6. ове методе),

– хемијски називи, CAS бројеви, структурне формуле (којима се указује на положај ^{14}C, ако се користи радиоактивно обележена супстанца) и релевантна физичко-хемијска својства супстанци које се користе као стандарди за идентификацију и квантификацију производа трансформације,

– чистоћа (нечистоће) испитиваних и референтних супстанци,

– радиохемијска чистоћа обележене хемикалије и специфична активност (по потреби).

2) Површинским водама:

За водени узорак навести најмање следеће податке:

– локација и опис места узорковања укључујући, по могућству, историју загађења,

– датум и време узимања узорка,

– хранљиве супстанце (укупни N, амонијум, нитрит, нитрат, укупни P, растворени ортофосфат),

– дубина узорковања,

– изглед узорка (нпр. боја и мутноћа),

– DOC и TOC,

– BOD,

– температура и pH на месту узорковања у време узорковања,

– кисеоник или редокс потенцијал (обавезно само ако аеробни услови нису очигледни),

– салинитет или проводљивост (у случају морске и сланкасте воде),

– суспендована чврста супстанца (у случају мутног узорка),

– по могућству и друге релевантне информације о месту узорковања у тренутку узорковања (нпр. актуелни или историјски подаци о брзини протока река или морских струја, значајнија испуштања отпадних вода у близини и врста отпадних вода, временски услови пре узорковања), и опционо:

– биомаса микроорганизама (нпр. директно бројање техником бојења акридин оранжом или CFU),

– неорганski угљеник,

– концентрација хлорофила као специфична процена биомасе алги.

Ако се врши испитивање са суспендованим седиментом, навести и следеће податке о седименту:

– дубина узимања седимента,

– изглед седимента (нпр. обојен, муљевит, прашкаст, или песковит),

– текстура (нпр. % крупног песка, финог песка, праха и иловаче),

– сува супстанца у g/l суспендоване чврсте супстанце, концентрација TOC или губитак масе након жарења као мера садржаја органске супстанце,

– pH,

– кисеоник или редокс потенцијал (обавезно само ако аеробни услови нису очигледни).

3) Условима испитивања:

– временски размак између узорковања и употребе у лабораторијском испитивању, складиштење узорка и претходна обрада узорка, датуми спровођења испитивања,

– примењена количина испитиване супстанце, испитивана концентрација и референтна супстанца,

– начин примене испитиване супстанце, укључујући сваку употребу растварача,

– запремина употребљене површинске воде и седимента (ако се користи) и запремина узорка који се узима на анализу у сваком времену узорковања,

– опис испитног система који се користи.

Ако се испитивање не може спровести у мраку, информације о условима „дифузног осветљења”:

– информације о методи/ама које су употребљене за припрему стерилних контрола (нпр. температура, време и број аутоклавирања),

– температура инкубације,

– информације о аналитичким техникама и методи/ама које се користе за радиохемијска мерења и проверу биланса масе и мерења фазне расподеле (ако се врше),

– број понављања.

4) Резултатима:

– проценат искоришћења (видети одељак 1.7.1. ове методе),

– поновљивост и осетљивост примењених аналитичких метода, укључујући границу детекције (LOD) и границу квантификације (LOQ) (видети одељак 1.7.2. ове методе),

– приказ свих измерених података (укључујући времена узорковања) и израчунатих вредности у табеларном облику и криве разградње; за сваку испитивану концентрацију и свако понављање навести коефицијент линеарне корелације за нагиб логаритамског графика, процењену фазу прилагођавања и константу брзине првог реда или псеудопрвог реда (по могућству) као и одговарајуће време полуразградње (односно време полуживота t_{50}),

– просеци резултата појединачних понављања за одговарајуће вредности, нпр. дужина фазе прилагођавања, константа брзине разградње и време полуразградње (или t_{50}),

– категоризовати систем као неприлагођени систем или прилагођени систем у односу на изглед криве разградње и могући утицај испитиване концентрације,

– резултати завршне провере биланса масе и резултати мерења фазне расподеле (према потреби),

– удео минерализованог ^{14}C и, ако се користе специфичне анализе, коначни ниво примарне разградње,

– идентификација, моларна концентрација и проценат примењене концентрације и главни производи трансформације (видети одељак 1.8.9.5. ове методе) према потреби,

– предложени пут трансформације, према потреби,

– тумачење резултата.

4. ЛИТЕРАТУРА

1. OECD TG 309 (2004) Aerobic Mineralisation in surface water – Simulation Biodegradation Test.

2. ISO/DIS 14592-1 (1999) Water quality – Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds at low concentrations – Part 1: Shake flask batch test with surface water or surface water/sediment suspensions.

3. Testing Method C.23. Aerobic and anaerobic transformation in soil.

4. Testing Method C.24. Aerobic and anaerobic transformation in aquatic sediments.

5. OECD (1993). Guidelines for the Testing of Chemicals. OECD, Paris.

6. ISO 8245 (1999). Water quality – Guidelines on the determination of total organic carbon (TOC) and dissolved organic carbon (DOC).

7. ISO 10634 (1995). Water quality – Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium.

8. OECD (2000). Guidance Document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No 22.

9. Simkins, S. and Alexander, M. (1984). Models for mineralisation kinetics with the variables of substrate concentration and population density. Appl. Environ. Microbiol.47, 394-401.

10. Ingerslev, F. and N. Nyholm. (2000). Shake-flask test for determination of biodegradation rates of 14C-labeled chemicals at low concentrations in surface water systems. Ecotoxicol. Environ. Saf. 45, 274-283.

11. ISO/CD 14592-1 (1999). Ring test report: Water Quality – Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds at low concentrations part 1 – report of 1998/1999 ring-test. Shake flask batch test with surface water or surface water/sediment suspensions.

Део други
ДОДАТАК 1.

Фазна расподела ^{14}C

Ради провере поступка, рутинска мерења активности преосталог укупног органског ^{14}C (TOA) допунити мерењима биланса масе са директним одређивањем добијеног $^{14}CO_2$ који се скупља у адсорберу (видети Додатак трећи ове методе). Потврда формирања $^{14}CO_2$ је сама по себи директан доказ биоразградње, за разлику од абиотичке разградње и других механизама губитака, као што је испаравање или сорпција. Додатне информације које могу бити корисне за описивање процеса биоразградње могу се добити мерењем расподеле TOA између растворeног облика (активност растворeног органског ^{14}C, DOA) и чврстог облика (активност чврстог органског ^{14}C, POA) након одвајања честица мембранском филтрацијом или центрифугирањем. POA се састоји од испитиване супстанце адсорбоване на биомасу микроорганизама и друге честице као и од угљеника садржаног у испитиваној супстанци који се користи за синтезу новог ћелијског материјала и тако се уграђује у чврсту фракцију биомасе. Формирање растворене органске супстанце ^{14}C може се одредити као DOA на крају биоразградње (плато криве разградње у зависности од времена).

Фазну расподелу преосталог ^{14}C у одабраним узорцима проценити филтрирањем узорака кроз мембрански филтер величине пора 0,22 µm или 0,45 µm израђен од материјала који не адсорбује значајне количине испитиване супстанце (нпр. поликарбонатни филтери). Ако је адсорпција испитиване супстанце на филтер превелика да би се могла занемарити (ово проверити пре експеримента), уместо филтрирања се може користити центрифугирање при великој брзини (2000 g; 10 min).

Са филтратом односно супернатантом се поступа као са нефилтрираним узорцима из Додатка 3. Мембрански филтери се растворе у одговарајућој течности за сцинтилацију и броји се на уобичајени начин, обично уз корекцију гашења (quenching) применом спољног стандарда (external standard ratio method) или се употреби оксидационо средство за узорак. Ако се користи центрифугирање, талог формиран од чврсте фракције се ресуспендује у 1 ml до 2 ml дестиловане воде и пренесе у бочицу за сцинтилацију. Затим се посуда двапут испере са 1 ml дестиловане воде и вода од испирања пренесе у бочицу. Суспензија се пре бројања методом течне сцинтилације може према потреби обложити гелом.

ДОДАТАК 2.

Полуконтинуирани поступак

У случају постојаних супстанци понекад је потребно продужити време инкубације и до неколико месеци да би се постигла довољна разградња. Испитивање по правилу не траје дуже од 60 дана, осим ако се испитивана суспензија обнавља како би се одржала изворна својства воденог узорка. Трајање испитивања се може продужити до највише 90 дана и без обнављања испитиване суспензије ако је разградња испитиване супстанце започела у првих 60 дана.

Код дуготрајније инкубације разноликост микробиолошке заједнице се може смањити због различитих механизама губитака и могућег исцрпљења залиха есенцијалних хранљивих супстанци и примарних супстрата угљеника у воденом узорку. Стога се код супстанци које се споро разграђују препоручује примена полуконтинуираног поступка како би се правилно одредила брзина разградње. Испитивање започети у полуконтинуираном поступку ако се на основу ранијих искустава очекује да ће за 20%-тну разградњу супстанце бити потребан период инкубације од три месеца. Друга могућност је да се уобичајени шаржни поступак замени за полуконтинуирани ако током приближно 60 дана испитивања шаржним поступком није дошло до разградње испитиване супстанце. Полуконтинуирани поступак се може прекинути и испитивање наставити шаржним поступком уколико се забележи значајна разградња (нпр. > 20%).

Код полуконтинуираног поступка сваке две недеље око једна трећине запремине испитиване суспензије замењује се свеже прикупљеном водом у коју је додата испитивана супстанца до почетне концентрације. Ако се користи факултативно испитивање са суспендованим седиментом, заменској води додати и седимент у почетној концентрацији (између 0,01 g/l и 1 g/l). Важно је нагласити да се у случају спровођења испитивања са суспендованим честицама седимента систем одржава у потпуној суспензији и током обнављања јер се у противном губи предвиђена сличност са хомогеним воденим системом без фиксних вода-седимент фаза. Из тих разлога, код примене полуконтинуираног поступка пожељно је да се почетна концентрација суспендованог седимента одабере из доњег део датог опсега.

Испитивана супстанца се додаје тако да код делимичног обнављања испитиване суспензије не дође до прекорачења

почетне концентрације испитиване супстанце, како би се избегло прилагођавање која се често јавља при високим концентрацијама испитиване супстанце. Будући да поступак обухвата и поновну инокулацију и надокнађивање потрошених хранљивих супстанци и примарних супстрата, изворна микробиолошка разноликост се поново успоставља и испитивање се теоретски може бесконачно продужавати. Код полуконтинуираног поступка, важно је напоменути да се преостала концентрација испитиване супстанце коригује у односу на количине испитиване супстанце које се додају и уклањају у сваком поступку обнављања. Укупна концентрација испитиване супстанце и концентрација растворене испитиване супстанце наизменично се користе у случају једињења код којих не долази до знатније сорпције. Сорпција је у утврђеним условима (0,1 g до 1 g чврсте супстанце/l) безначајна (< 5%) код супстанци са log K_{ow} < 3 (важи за неутрална, липофилна једињења). То се може видети и на следећем рачунском примеру: 0,1 g/l чврсте супстанце отприлике одговара 10 mg угљеника по литру (удео угљеника f_C = 0,01).

Под претпоставком да је:

Log K_{ow} (испитиване супстанце) = 3

$K_{oc} = 0,42 \times K_{ow}$

Коефицијент расподеле, $K_d = f_c \times K_{oc}$

тада је растворена фракција укупне концентрације (C-вода (C_w)/C-укупни (C_t):

$C_w/C_t = 1/(1 + K_d \times SS) = 1(1 + K_{oc} \times f_C \times SS) = 1/(1 + 0,42 \times 10^3 \times 0,01 \times 0,1 \times 10^{-3}) = 0,999$

ДОДАТАК 3.

Одређивање $^{14}CO_2$

Индиректно одређивање $^{14}CO_2$

Код рутинских мерења индиректна метода по правилу захтева најмање времена и најпрецизнија је уколико испитиване супстанце нису испарљиве и не прелазе у испарљиве производе трансформације. Нефилтрирани узорци од нпр. 5 ml се једноставно пренесу у бочице за сцинтилацију. Одговарајућа почетна активност у узорцима је 5000 dpm до 10000 dpm (80 Bq до 170 Bq), а минимална почетна активност износи око 1.000 dpm. CO_2 се излучује након закишељавања на pH 2-3 са 1 до 2 капи концентроване H_3PO_4 или HCl. Излучивање CO_2 се може спровести удувавањем мехурића ваздуха око ½ сата до 1 сата. Као друга могућност, бочице се могу снажно протресати 1 до 2 сата (нпр. на тресилици са плочом) или се уз лакше протресање оставе на тресилици преко ноћи. Ефикасност поступка одвајања CO_2 проверити (продужењем времена проветравања или трешења). Затим се дода течност за сцинтилацију погодна за бројање водених узорака, узорак се хомогенизује на вортексу и одреди радиоактивност методом течне сцинтилације и одузме основна активност утврђена у слепим пробама (F_B). Ако вода за испитивање није јако обојена и не садржи високу концентрацију честица, узорци ће по правилу показивати уједначено гашење (quenching) и биће довољно да се изврше корекције за гашење применом спољног стандарда. Ако је вода за испитивање јако обојена, корекција за гашење се понекад врши додавањем унутрашњег стандарда. Уколико је концентрација честица висока није увек могуће добити хомогени раствор односно гел, или се могу јавити велике разлике у гашењу међу узорцима. У том случају се може применити метода бројања за испитивани муљ која је описана у наставку. Ако се користи испитивање са суспендованим седиментом, мерење $^{14}CO_2$ се може обавити индиректно тако што се узме хомогени узорак испитиване воде/суспензије од 10 ml и фазе одвоје центрифугирањем на одговарајућој брзини (нпр. 15 минута на 40.000 m/s^2). Затим се и са воденом фазом поступа како је горе описано. Активност ^{14}C у чврстој фази (POA) одређује се тако што се седимент ресуспендује у малој запремини дестиловане воде, пренесе у бочице за сцинтилацију и затим дода течност за сцинтилацију како би се добио гел (за ово су предвиђене посебне течности за сцинтилацију). Зависно од врсте честица (нпр. садржај органског материјала у њима), узорак се евентуално може оставити преко ноћи да се раствори у средству за растварање ткива, затим хомогенизовати на вортексу и онда додати течност за сцинтилацију. Друга могућност је да се POA одреди сагоревањем вишка кисеоника помоћу оксидационог средства. Код бројања увек укључити интерне стандарде, а корекције за гашење понекад направити додавањем унутрашњег стандарда у сваки појединачни узорак.

Директно одређивање $^{14}CO_2$

Ако се настали $^{14}CO_2$ мери директно на почетку испитивања припремити више судова за испитивање и у свакој мерној тачки узимати читав садржај узорка, закиселити на pH 2 до 3 и скупљати $^{14}CO_2$ у унутрашњем адсорберу (који се ставља у сваки испитивани узорак на почетку испитивања) или спољном адсорберу. Као адсорпциоино средство може се користити алкална супстанца (нпр. раствор 1 N NaOH или чврсти NaOH), етаноламин или адсорбери на бази етаноламина који су доступни на тржишту. Код директног мерења $^{14}CO_2$ судови су затворени нпр. затварачима од бутилне гуме.

Слика 1а. Пример аритметичког приказа података (преостала активност у зависности од времена)

Слика 1б. Пример полулогаритамског приказа података (ln преостале активности у зависности од времена)

C.26. ИСПИТИВАЊЕ ИНХИБИЦИЈЕ РАСТА *LEMNA SP.*

Део први

1. МЕТОДА ИСПИТИВАЊА

Ова метода заснива се на Упутству за испитивање OECD 221 (2006)[1]. Међу телима ЕУ постоји општа сагласност да је у случају јако обојених супстанци испитивање на *Lemna sp.* одговарајућа алтернатива испитивању на алгама[2,3].

1.1. УВОД

Ова метода испитивања је осмишљена за процену токсичности супстанце по слатководне биљке рода *Lemna* (сочивица). Она се заснива на постојећим смерницама[4,5,6,7,8,9], али укључује неке измене тих метода у светлу последњих истраживања и саветовања о низу кључних питања. Предложена метода је валидирана међународним међулабораторијским испитивањем („ring-test")[10].

У овој методи испитивања описана су испитивања токсичности на врстама *Lemna gibba* и *Lemna minor*, које су подробно проучене и предмет су горе наведених стандарда. Таксономија *Lemna spp.* је сложена због великога броја различитих фенотипова. Иако се у одговору на токсично дејство код врста *Lemna* може јавити генетичка варијабилност, тренутно нема довољно података о том извору варијабилности да би се могао препоручити неки одређени клон за ову методу испитивања. Треба запазити да се испитивање не изводи аксенично, али се у појединим фазама поступка испитивања предузимају кораци како би се загађење другим организмима свело на најмању могућу меру.

Дати су детаљи испитивања са обнављањем (полустатичко и проточно) и без обнављања (статичко) раствора за испитивање. Зависно од циљева испитивања и регулаторних захтева, препоручује се да се испита могућност примене полустатичких и проточних метода (нпр. код супстанци које се брзо нестају из раствора услед испаравања, фотохемијске

разградње, таложења или биоразградње). Додатне смернице дате су у литератури[11].

1.2. ДЕФИНИЦИЈЕ

Поједини изрази употребљени у овој методи испитивања имају следеће значење:

Биомаса јесте сува маса живе материје у популацији. У овој методи се по правилу мере алтернативни параметри биомасе, као што је број фрондова и површина фрондова, па се израз биомаса односи и на те алтернативне мере.

Хлороза јесте жутило лисног ткива.

Клон јесте организам или ћелија настала од појединачне јединке путем бесполног размножавања. Према томе, јединке које потичу од истог клона су генетски истоветне.

Колонија означава здружене родитељске и потомачке фрондове (обично 2 до 4) који су међусобно спојени. Понекад се назива и биљком.

EC_x јесте концентрација испитиване супстанце растворене у подлози за испитивање која доводи до x%-тног (нпр. 50%) смањења раста *Lemna* у оквиру наведеног периода излагања (које изричито навести ако одступа од пуног или уобичајеног трајања испитивања). Да би се недвосмислено показало да ли је вредност EC добијена из брзине раста или из прираста користи се симбол „ErC" за брзину раста (growth rate) и „EyC" за прираст (yield), иза чега се наводи мерна променљива нпр. ErC (број фрондова).

Проточно испитивање јесте испитивање у ком се испитивани раствори стално замењују.

Фронд јесте засебна/појединачна листолика структура биљке сочивице. Најмања је репродуктивно способна јединица односно јединка.

Набреклина означава фрондове грбавог или набрекнутог изгледа.

Раст јесте повећање мерне променљиве, нпр број фрондова, сува маса, влажна маса или површина фрондова, у периоду испитивања.

Брзина раста (просечна специфична брзина раста) јесте логаритамско повећање биомасе у периоду излагања.

Најнижа концентрација са запаженим ефектом (у даљем тексту: LOEC) јесте најнижа испитана концентрација при којој је током одређеног периода излагања запажено да супстанци статистички значајан ефекат успоравања раста (при $p < 0,05$) у поређењу са контролом. Међутим, све испитиване концентрације изнад LOEC потребно је да имају једнак или већи штетан ефекат од онога који је забележен при LOEC. Ако се ова два услова не могу испунити, детаљно објаснити како је одабран LOEC (а према томе и NOEC).

Мерне променљиве јесу све врсте променљивих величина које се мере како би се изразио праћени параметар испитивања применом једне или више променљивих одговора. Код ове методе мерне променљиве су број фрондова, површина фрондова, свежа маса и сува маса.

Монокултура јесте култура која садржи једну биљну врсту.

Некроза јесте мртво (тј. бело или водом натопљено) ткиво фронда.

Највиша концентрација без запаженог ефекта (у даљем тексту: NOEC) јесте испитивана концентрација непосредно испод LOEC.

Фенотип јесу видљиве карактеристике организма одређене интеракцијом његових гена и животне средине.

Променљиве одговора јесу променљиве величине за процену токсичности изведене из било које мерене променљиве која описује биомасу применом различитих метода израчунавања. Код ове методе брзине раста и прираста јесу променљиве одговора изведене из мерних променљивих као што су број фрондова, површина фрондова, свежа маса или сува маса.

Полустатичко испитивање (испитивање са обнављањем) јесте испитивање где се испитивани раствор замењује периодично, у одређеним размацима, током испитивања.

Статичко испитивање јесте метода испитивања где се испитивани раствор не обнавља током испитивања.

Праћени параметар испитивања описује општи фактор који ће се мењати услед дејства испитиване хемикалије у односу на контролу као циљ испитивања. Код ове методе праћени параметар испитивања је инхибиција раста, која се може изразити различитим променљивим одговора које се заснивају на једној или више мерних променљивих.

Подлога за испитивање јесте целокупна синтетичка хранљива подлога на којој испитиване биљке расту кад се изложе испитиваној супстанци. Испитивана супстанца ће се обично растворити у подлози за испитивање.

Прираст јесте вредност мерне променљиве којом се изражава разлика између биомасе на крају периода излагања и мерне променљиве на почетку периода излагања.

1.3. ПРИНЦИП ИСПИТИВАЊА

Експоненцијално растуће биљне културе рода *Lemna* пусте се да расту као монокултуре у различитим концентрацијама испитиване материје у периоду од седам дана. Циљ испитивања је да се квантификују ефекти супстанце на вегетативни раст

током овог периода на основу процене одабраних мерних променљивих. Број фрондова је примарна мерна променљива. Осим тога, мери се најмање још једна мерна променљива (укупна површина фрондова, сува маса или свежа маса), будући да неке супстанце знатно више утичу на неке друге мерне променљиве него на број фрондова. Да би се квантификовали ефекти супстанце, раст у испитиваним растворима се упоређује са растом у контролама и одређује се концентрација која изазива одређени проценат (x%) инхибиције раста (нпр. 50%), која се изражава као EC_x (нпр. EC_{50}).

Праћени параметар испитивања је инхибиција раста, који се изражава као логаритамско повећање мерне променљиве (просечна специфична брзина раста) у периоду излагања. Из просечних специфичних брзина раста забележених у серији испитиваних раствора одређује се концентрација која изазива одређено x%-тно смањење брзине раста (нпр. 50%), која се изражава као ErCx (нпр. ErC_{50}).

У овој методи испитивања користи се и додатна променљива одговора, прираст, која је потребна да би се испунили посебни регулаторни захтеви у неким државама. Он се дефинише као разлика између мерних варијабли на крају периода излагања и мерних варијабли на почетку периода излагања. Из прираста забележеног у серији испитиваних раствора израчунава се концентрација која изазива одређено x%-тно смањење прираста (нпр. 50%), која се изражава као E_yC_x (нпр. E_yC_{50}).

Осим тога, може се статистички одредити најнижа концентрација са запаженим ефектом (LOEC) и највиша концентрација без запаженог ефекта (NOEC).

1.4. ИНФОРМАЦИЈЕ О ИСПИТИВАНОЈ СУПСТАНЦИ

Аналитичка метода одговарајуће осетљивости за кванитификацију супстанце у подлози за испитивање потребно је да буде на располагању.

Информације о испитиваној супстанци које могу бити корисне при успостављању услова испитивања су: структурна формула, чистоћа, растворљивост у води, стабилност у води и фотостабилност, pK_a, K_{ow}, напон паре и биоразградљивост. Растворљивост у води и напон паре могу се употребити за израчунавање константе Хенријевог закона, из које се може закључити да ли у периоду испитивања очекивати значајне губитке испитиване супстанце. То ће помоћи да се утврди да ли је потребно предузети одређене мере да се такви губици контролишу. Ако су подаци о растворљивости и стабилности испитиване супстанце несигурне, препоручује се да се растворљивост и стабилност испитиване супстанце процењује у условима испитивања тј. хранљива подлога, температура, режим осветљења који ће се користити у току испитивања.

У случајевима када је контролисање pH вредности подлоге за испитивање нарочито важно, нпр. код испитивања метала или супстанци које су хидролитички нестабилне, препоручује се да се у хранљиву подлогу дода пуфер (видети одељак 1.7.4. ове методе). Додатне смернице за испитивање супстанце чија физичко-хемијска својства отежавају испитивање дате су у литератури[11].

1.5. РЕФЕРЕНТНА СУПСТАНЦА

Једна или више референтних супстанци као нпр. 3,5-дихлорфенол коришћен у међународном међулабораторијском испитивању[10], могу се испитати за проверу поступка испитивања. Препоручљиво је да се референтна супстанца испита најмање двапут годишње или, ако се испитивање спроводи ређе, истовремено са одређивањем токсичности испитиване супстанце.

1.6. ВАЛИДНОСТ ИСПИТИВАЊА

Да би испитивање било валидно, време потребно да се број фрондова у контролном узорку удвостручи је краће од 2,5 дана (60 сати), што приближно одговара седмороструком повећању за седам дана и просечној специфичној брзини раста од 0,275 d^{-1}. Уз подлоге и услове испитивања описане у овој методи испитивања овај критеријум се може задовољити применом статичког режима испитивања[8]. Такође се очекује да ће овај критеријум моћи да се испуни у полустатичким и проточним условима испитивања. Израчунавање времена удвостручења приказано је у одељку 2.1. ове методе.

1.7. ОПИС МЕТОДЕ

1.7.1. Апаратура

Сва опрема која долази у додир са подлогама за испитивање је израђена од стакла или другог хемијски инертног материјала. Стаклена опрема која се користи за гајење и испитивање је стерилна и очишћена од хемијских загађивача који би могли доспети у подлогу за испитивање. Судови за испитивање су довољно широки да фрондови различитих колонија у судовима са контролом могу расти тако да на крају испитивања не дође до њиховог преклапања. Не смета ако корење додирује дно суда за испитивање, али препоручује се да све судови за испитивање имају дубину од најмање 20 mm и запремину од најмање 100 ml. Избор суда за испитивање није битан све док су ови захтеви испуњени. Стаклене чаше, судови за кристализацију и стаклене петри шоље одговарајућих димензија су се показали као подесни. Судове за испитивање прекрити како би се смањило испаравање и случајно загађење, али притом омогућити нужан проток ваздуха. Одговарајући судови за испитивање, а нарочито поклопци, не смеју стварати сенку нити изазивати промене у карактеристикама спектра светлости.

Културе и судови за испитивање се не држе заједно. То је најлакше постићи ако се користе одвојене коморе за гајење, инкубатори, односно просторије. Осветљење и температуру контролисати и одржавати на сталном нивоу (видети одељак 1.7.8. ове методе).

1.7.2. Испитивани организам

Организам који се користи за потребе овог испитивања је *Lemna gibba* или *Lemna minor*. Кратак опис врста сочивице које се користе у испитивањима токсичности дат је у Додатку 1. ове методе. Биљни материјал се може набавити у збиркама култура, из друге лабораторије или прикупити на терену. Ако се материјал прикупља на терену, биљке држати у култури на истој подлози каква ће се користити у испитивању, најмање осам недеља пре употребе. Места на којима се прикупљају полазне културе не смеју бити контаминирана очигледним изворима загађења. Ако се културе набављају из друге лабораторије или из збирке култура, држати их у сличним условима најмање три недеље. Извор биљног материјала и врсту и клон (ако је познат) који се користе код испитивања сваки пут документовати.

Треба користити монокултуре код којих нису присутна видљива загађења другим организмима као што су алге и протозое. Здраве биљке *L. minor* састоје се од колонија које садрже између два и пет фрондова, док здраве колоније *L. gibba* могу да имају и до седам фрондова.

Квалитет и једноликост биљака које се користе у испитивању имају значајан утицај на резултате испитивања па биљке пажљиво одабрати. Користити младе, брзо растуће биљке без видљивих оштећења и промена боје (хлороза). Својство квалитетних култура је висок удео колонија које садрже најмање два листа. Велики број колонија са појединачним фрондом указује на срединski стрес (нпр. ограничена количина хранљивих материја) па биљни материјал из таквих култура не користити код испитивања.

1.7.3. Гајење културе

Да би се смањили захтеви одржавања културе (нпр. кад одређено време нису планирана испитивања са сочивицом), културе се могу држати под смањеним осветљењем и на нижој температури (4° C до 10° C). Информације о узгајању дате су у Додатку 2. ове методе. У случају очигледних знакова загађења алгама и другим организмима, подузорак фрондова *Lemna* подвргнути површинској стерилизацији и пренети га у свежу подлогу (видети Додатак други ове методе). У овом случају остатак загађене културе бацити.

Најмање седам дана пре испитивања довољан број колонија асептички пренети у свежу стерилну подлогу и узгајати 7 до 10 дана у условима испитивања.

1.7.4. Подлога за испитивање

За врсте *Lemna minor* и *Lemna gibba* препоручују се различите подлоге, како је описано у даљем тексту. Ако се сумња да би pH пуфер у подлози за испитивање (MOPS (4-морфолинпропан-сулфонска киселина, CAS бр. 1132-61-2, EINECS бр. 214-478-5) за подлогу *L.minor* и $NaHCO_3$ за подлогу *L.gibba*) могао да реагује са испитиваном супстанцом и тако утиче на експресију њене токсичности, размислити пре него што се пуфер дода у подлогу за испитивање. Прихватљива је и подлога Штајнберг[12] под условом да су задовољени критеријуми валидности.

За гајење културе и испитивање са *L. minor* препоручује се измењена варијанта хранљиве подлоге Лемна према шведском стандарду (SIS). Састав ове подлоге наведен је у Додатку 3. ове методе.

Хранљива подлога 20X – AAP, описана у Додатку 3. ове методе, препоручује се за узгајање културе и испитивања са *L.gibba*.

Подлога Штајнберг која је описана у Додатку 3. погодна је и за *L. minor*, али се може користити и за *L.gibba* под условом да су задовољени критеријуми валидности.

1.7.5. Раствори за испитивање

Раствори за испитивање обично се припремају разређивањем радног раствора. Радни раствори испитиване супстанце се обично припремају растварањем супстанце у хранљивој подлози.

Највиша испитивана концентрација испитиване супстанце по правилу не сме да премаши растворљивост супстанце у води у условима испитивања. Треба напоменути да *Lemna spp.* плута на површини и да може бити изложена супстанцама која се скупљају у међупростору вода – ваздух (нпр. супстанце које су слабо растворљиве у води, хидрофобне супстанце, површински активне супстанце). Под таквим околностима излагање произилази од супстанце која се налази изван раствора и испитиване концентрације могу, зависно од својстава испитиване супстанце, премашивати растворљивост у води. Код испитиваних супстанци ниске растворљивости у води понекад је потребно припремити концентровани радни раствор или дисперзију супстанци користећи органски растварач или средство за диспергovање, како би се олакшало додавање тачних количина испитиване супстанце у подлогу за испитивање и поспешило њено диспергovање и растварање. Треба настојати да се избегне коришћење таквих материјала кад год је то могуће. Употребљени помоћни растварачи односно средства за диспергovање не би смели да имају фитотоксично дејство. На пример, у обично коришћене растваваче у широкој употреби који немају фитотоксично дејство у концентрацијама до 100 $\mu l \cdot l^{-1}$ обухватају ацетон и диметилформамид. Ако се користи растварач или средство за диспергovање, навести његову коначну концентрацију и одржавати је на минимуму (≤ 100 $\mu l \cdot l^{-1}$), а све обраде и контроле потребно је да садрже исту концентрацију растварача односно средства за диспергovање. Додатне смернице о употреби диспергената наведене су у литератури[11].

1.7.6. Испитиване и контролне групе

Претходна сазнања о токсичности испитиване супстанце по сочивици, нпр. на основу испитивања за одређивање опсега, могу помоћи у избору одговарајућих испитиваних концентрација. Код коначног испитивања токсичности обично је потребно најмање пет испитиваних концентрација распоређених у геометријском низу. Испитиване концентрације се по могућству не би смеле разликовати за фактор виши од 3,2, али може се користити и виша вредност ако је крива концентрација-одговор равна. Ако се користи мање од пет концентрација, дати образложење. За сваку испитивану концентрацију потребно је најмање три понављања.

Код одређивања опсега испитиваних концентрација (за одређивање опсега и/или коначно испитивање токсичности) узети у обзир следеће:

– Да би се код одређивања EC_x обезбедио потребан ниво поузданости, вредност EC_x се налази између највише и најниже испитиване концентрације. На пример, ако се процењује EC_{50}, највиша испитивана концентрација је виша од EC_{50}. Ако се вредност EC_{50} налази изван опсега испитиваних концентрација, припадајући интервали поверења биће велики и можда неће бити могуће исправно оценити статистичку подесност модела.

– Ако је циљ да се процени LOEC/NOEC, најнижа испитивана концентрација је довољно ниска да раст не буде значајно нижи од раста у контролној групи. Исто тако, највиша испитивана концентрација је потребно да буде довољно висока да раст буде значајно нижи него у контролној групи. Ако то није случај, испитивање поновити с другим распоном концентрација (осим ако је највиша концентрација на граници растворљивост или је једнака максималној потребној граничној концентрацији, нпр. 100 $mg \cdot l^{-1}$).

Свако испитивање обухвата контроле са истом хранљивом подлогом, истим бројем фрондова и колонија, срединским условима и поступцима као код судова за испитивање, али без испитиване супстанце. Ако се користи помоћни растварач или средство за диспергovање, потребна је додатна контрола која садржи исту концентрацију растварача/средства за диспергovање као судови са испитиваном супстанцом. Број судова са контролним понављањима (и судова са растварачем, ако се користи) је најмање једнак броју судова који се користе за сваку испитивану концентрацију, а по могућству и двоструко већи.

Ако није потребно да се одреди NOEC, поставка испитивања се може изменити тако да се повећа број концентрација и смањи број понављања по концентрацији. Број контролних понављања је најмање три.

1.7.7. Излагање

Колоније које се састоје од 2 до 4 видљива фронда пренесу се из културе инокулума и насумично расподеле по судовима за испитивање под асептичним условима. Сваки суд за испитивање садржи укупно 9 до 12 фрондова. Број фрондова и колонија је једнак у свим судовима за испитивање. Искуства са овим методом и подаци из међулабораторијског испитивања показују да је довољно користити три понављања по обради, од којих свако у почетку садржи 9 до 12 фрондова, да се између обрада утврде разлике у расту на нивоу инхибиције од око 4% до 7%, израчунато на основу брзине раста (10% до 15% израчунато на основу прираста)[10].

Судове за испитивање насумично распоредити по инкубатору како би се смањио утицај просторних разлика у интензитету осветљења или температури. Осим тога, приликом опажања применити блок систем или случајно размештање судова (или чешће размештање).

Ако прелиминарно испитивање стабилности покаже да се концентрација испитиване супстанце не може одржати (тј. измерена концентрација падне испод 80% измерене почетне концентрације) у току периода испитивања (7 дана), препоручује се полустатички режим испитивања. У том случају колоније изложити свеже припремљеним испитиваним и контролним растворима најмање двапут током испитивања (нпр 3. дан и 5. дан). Учесталост излагања свежој подлози зависиће од стабилности испитиване супстанце; у случају јако нестабилних и испарљивих супстанци потребно је чешће излагање свежој подлози да би се одржале приближно сталне концентрације. У одређеним околностима може бити потребна примена проточног поступка[11,13].

Ова метода испитивања не обухвата сценарио излагања код фолијарне примене (спреј), уместо тога видети литературу[14].

1.7.8. Услови инкубације

Потребно је користити непрекидно топло или хладно бело флуоресцентно осветљење чији интензитет одабрати у распону од 85 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ до 135 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, мерено у области фотосинтетички активног зрачења (400 nm до 700 nm) у тачкама које су једнако удаљене од извора светла и фрондова сочивице (што одговара 6.500 lux до 10.000 lux). Одступања од одабраног интензитета светла у испитиваном простору не смеју бити виша од ± 15%. На измерену вредност утицаће метод детекције и мерења светла, нарочито врста сензора. Сферичним сензорима (који реагују на светло из свих углова изнад и испод мерне равни) и косинусним сензорима (који реагују на светло из свих углова изнад мерне равни) даје се предност у односу на усмерене сензоре јер дају виша очитавања код извора светлости из више тачака какав је овде описан.

Температура у судовима за испитивање је 24° C ± 2° C. pH вредност контролне подлоге се током испитивања не сме повећати за више од 1,5 јединица. Одступање за више од 1,5 јединица не доводи у питање валидност испитивања ако се може доказати да су задовољени критеријуми валидности. Помак pH вредности ипак у неким посебним случајевима захтева додатан опрез нпр. кад се испитују нестабилне супстанце и метали.

1.7.9. Трајање

Испитивање се прекида 7 дана након што се биљке пренесу у судове за испитивање.

1.7.10. Мерења и аналитичка одређивања

На почетку испитивања изброје се листови у свим судовима за испитивање и забележи број фрондова, водећи рачуна да се узму у обзир сви истурени, јасно видљиви фрондови. Број фрондова нормалног и промењеног изгледа одредити на почетку испитивања, најмање једном свака 3 дана током периода излагања (тј. најмање 2 пута у периоду од 7 дана) и по завршетку испитивања. Треба забележити све промене у развоју биљака нпр. величина фрондова, изглед, назнаке некрозе, хлорозе или набреклине, распадање колонија, губитак способности пливања као и промене дужине и изгледа корења. Такође

забележити значајна својства подлоге која се користи током испитивања (нпр. присутност нераствореног материјала, раст алги у суду за испитивање).

Осим одређивања броја фрондова током испитивања, потребно је оценити ефекте испитиване супстанце на једну (или више) следећих мерних променљивих:

1) укупна површина фрондова;

2) сува маса;

3) свежа маса.

Одређивање укупне површине фрондова има предност зато што се може одредити у сваком испитиваном и контролном суду на почетку, за време и на крају испитивања. Сува односно свежа маса одређује се на почетку испитивања – на узорку културе инокулума која је репрезентативна за материјал који се користи на почетку испитивања, и на крају испитивања – на биљном материјалу из сваког испитиваног и контролног суда. Ако се не мери површина фрондова, сувој маси се даје предност у односу на свежу масу.

Укупна површина фрондова, сува маса и свежа маса могу се одредити на следећи начин:

1) Укупна површина фрондова: Укупна површина фрондова свих колонија може се одредити анализом слике. Обрис суда за испитивање и биљака сними се видео-камером (нпр. посуда се положи на расветну кутију) и добијена слика се дигитализује. Укупна површина фрондова у посуди за испитивање може се затим одредити калибрацијом са равним облицима познате површине. При том водити рачуна да се искључи утицај ивице суда за испитивање. Други, нешто заморнији поступак је да се суд за испитивање и биљке фотокопирају, добијени обрис колонија исече и одреди површина уз помоћ анализатора површине фрондова или милиметарског папира. Могу бити погодне и друге технике (нпр. однос папирне масе између површине обриса колонија и јединичне површине).

2) Сува маса: Изваде се све колоније из судова за испитивање и исперу дестилованом или дејонизованом водом. Вишак воде се упије папиром и колоније суше на 60° C док се не постигне стална маса. Треба укључити све остатке корења. Суву масу изразити са тачношћу од најмање 0,1 mg.

3) Свежа маса: Све колоније се пренесу у претходно извагане полистиренске епрувете (или епрувете од другог инертног материјала) које у заобљеном дну имају ситне рупице (1 mm). Епрувете се затим 10 минута центрифугирају на 3.000 о/мин при собној температури. Епрувете, које сада садрже осушене колоније, поново се измере и израчуна се свежа маса одузимањем масе празне епрувете.

1.7.10.1. Учесталост мерења и аналитичких одређивања

Ако се примењује статички поступак, pH вредност се мери у свакој обради на почетку и на крају испитивања. Уколико се користи полустатички поступак pH измерити у свакој шаржи свежег испитиваног раствора пре сваког обнављања као и у одговарајућим потрошеним растворима.

Интензитет светла мери се у комори за узгајање, инкубатору односно просторији у тачкама које су једнако удаљене од извора светла и фрондова сочивице. Мерења се врше најмање једном током испитивања. Осим тога, најмање једном дневно бележити температуру подлоге у једном заменском („сурогат”) суду који се држи у истим условима у комори за узгајање, инкубатору односно просторији.

Током испитивања, концентрације испитиване супстанце одређују се у одговарајућим интервалима. Код статичког испитивања концентрације одредити најмање на почетку и на крају испитивања.

Ако се у случају полустатичког испитивања претпоставља да концентрација испитиване супстанце неће остати у границама ± 20% номиналне концентрације, потребно је анализирати све свеже припремљене испитиване растворе и затим поновити анализу код сваког обнављања (видети одељак 1.7.7. ове методе). Код испитивања где измерена почетна концентрација испитиване супстанце није у границама ± 20% номиналне концентрације, али има довољно доказа да су почетне концентрације поновљиве и стабилне (тј. у распону 80% до 120% почетне концентрације), хемијска одређивања се могу спроводити само на највишој и најнижој испитиваној концентрацији. У сваком случају, одређивање концентрација испитиване супстанце пре обнављања обавити само на једном суду за сваку испитивану концентрацију (или на састављеном садржају посуда понављања).

Ако се примењује проточни поступак, користи се сличан режим узорковања као што је онај који је описан за полустатичка испитивања, укључујући анализу на почетку, у средини и на крају испитивања, с тим да овде нема мерења истрошеног раствора. Код оваквих испитивања свакодневно проверавати брзину протока воде за разређивање и испитиване супстанце, односно радног раствора испитиване супстанце.

Ако се може доказати да се концентрација испитиване супстанце током укупног трајања испитивања на задовољавајући начин одржава у границама ± 20% номиналне или измерене почетне концентрације, анализа резултата се може заснивати на номиналним или измереним почетним вредностима. Ако је одступање од номиналне односно измерене почетне концентрације веће од ± 20%, анализа резултата заснива се на средњој геометријској концентрацији током излагања или моделима који описују опадање концентрације испитиване супстанце[11].

1.7.11. Гранично испитивање

У одређеним околностима, нпр. кад прелиминарно испитивање указује на то да испитивана супстанца нема токсично дејство у концентрацијама до 100 $mg \cdot l^{-1}$ или до њене границе растворљивости у подлози за испитивање (зависно од тога шта

је мање), могуће је обавити гранично испитивање како би се одговор испитиване групе (100 $mg \cdot l^{-1}$ или концентрација једнака граници растворљивости) упоредио са контролном групом. Препоручује се да се уз гранично испитивање свакако изврши анализа концентрације излагања. За гранично испитивање важе сви поменути услови испитивања и критеријуми валидности, с тим да број понављања у испитиваној групи удвостручити. Раст у контролној и испитиваној групи може се анализирати статистичким тестом за поређење средњих вредности, нпр. Студентов т-тест.

2. ПОДАЦИ И ИЗВЕШТАВАЊЕ

2.1. ВРЕМЕ УДВОСТРУЧЕЊА

Да би се одредило време које је потребно да се број фрондова удвостручи (T_d) и утврдило да ли истраживање испуњава овај критеријум валидности (видети одељак 1.6. ове методе), са подацима добијеним из судова са контролом користи се формула:

$T_d = ln\ 2/\mu$

где је просечна специфична брзина раста m одређена на начин како је описано у одељку 2.2.1 ове методе.

2.2. ПРОМЕНЉИВЕ ВЕЛИЧИНЕ ОДГОВОРА

Сврха испитивања је да се утврде ефекти испитиване супстанце на вегетативни раст сочивице. У овој методи испитивања описане су две променљиве величине одговора, будући да државе чланице имају различите повластице и регулаторне захтеве. Да би резултати испитивања били прихватљиви у свим државама чланицама, ефекте процењивати применом обе променљиве величине одговора и то:

а) Просечне специфичне брзине раста. Ова променљива величина одговора израчунава се на основу промена логаритама броја фрондова и, осим тога, на основу промена логаритама неког другог мерног параметра (укупна површина фрондова, сува маса или свежа маса) у времену (изражено по дану) у контролама и свим испитиваним групама. Она се понекад назива и релативна брзина раста[15].

б) Прираста. Ова променљива величина одговора израчунава се на основу промена броја фрондова и, осим тога, на основу промена неког другог мерног параметра (укупна површина фрондова, сува маса или свежа маса) у контролама и свим испитиваним групама до краја испитивања.

Треба напоменути да вредности токсичности израчунате применом те две променљиве величине одговора нису упоредиве и ту разлику узети у обзир код коришћења резултата испитивања. Ако су поштовани услови испитивања ове методе, вредности EC_x које се заснивају на просечној специфичној брзини раста (E_rC_x) углавном ће бити више од резултата на заснованих на прирасту (E_yC_x) због разлике у математичкој основи та два приступа. То не тумачити као разлику у осетљивости две променљиве величине одговора, већ просто прихватити да су те вредности математички различите. Појам просечне специфичне брзине раста заснива се на општем обрасцу експоненцијалног раста сочивице у неограниченим културама, где се токсичност процењује на основу ефеката на брзину раста независно од апсолутне вредности специфичне брзине раста у контролној групи, нагиба криве концентрација-одговор или трајања испитивања. За разлику од тога, резултати који се заснивају на променљивој величини одговора „прираст" зависе од свих тих других променљивих величина. E_yC_x зависи од специфичне брзине раста врста сочивице које се користе у сваком испитивању и од максималне специфичне брзине раста која се може разликовати између врста сочивице, па чак и између клонова. Ову променљиву одговора не користити за упоређивање осетљивости на отрове међу врстама сочивице, па чак ни међу различитим клоновима. Иако се, са научне тачке гледишта, процени токсичности на основу просечне специфичне брзине раста даје предност, у ову метода испитивања укључене су и процене на основу прираста како би се задовољили тренутни регулаторни захтеви у неким државама.

Процене токсичности заснивати на броју фрондова и једној додатној мерној променљивој (укупна површина фрондова, сува маса или свежа маса) будући да неке супстанце знатно више утичу на неке друге мерне променљиве него на број фрондова. Тај би утицај остао неоткривен кад би се само рачунао број фрондова.

Број фрондова као и све друге документоване мерне променљиве, тј. укупна површина фрондова, сува маса или свежа маса, се уносе у табелу, заједно са концентрацијама испитиване супстанце при сваком мерењу. Каснија анализа података, нпр. за процену вредности LOEC, NOEC или EC_x, заснива се на вредностима појединачних понављања, а не на израчунатим средњим вредностима по испитиваним групама.

2.2.1. Просечна специфична брзина раста

Просечна специфична брзина раста за одређени период израчунава се као логаритамско повећање променљивих величина раста – број фрондова и још једна мерна променљива (укупна површина фрондова, сува маса или свежа маса) – применом формуле у даљем тексту за свако понављање у контролама и обрадама:

$$\mu_{i-j} = \frac{ln(N_j) - ln(N_i)}{t}$$

при чему:

μ_{i-j} јесте просечна специфична брзина раста од времена i до времена j;

N_i јесте мерна променљива у испитиваном или контролном суду и у времену i;

N_j јесте мерна променљива у испитиваном или контролном суду у времену j;

t јесте временски период од i до j.

За сваку испитивану и контролну групу израчунати средњу вредност брзине раста са проценом варијансе.

Просечну специфичну брзину раста израчунати за читав период испитивања (време „i" на наведеној формули јесте почетак испитивања, а време „j" јесте крај испитивања). За сваку испитну концентрацију и контролу израчунати средњу вредност специфичне брзине раста са проценом варијансе. Осим тога, оцењује се етапна брзина раста како би се оценили ефекти испитиване супстанце који се јављају током периода излагања (нпр. прегледом логаритамски трансформираних кривих раста). Значајне разлике између етапне брзине раста и просечне брзине раста указују на одступање од сталног експоненцијалног раста и упозоравају да је потребно детаљно преиспитивање крива раста. Конзервативнији приступ у оваквим случајевима био би да се упореде специфичне брзине раста обрађених култура у периоду максималне инхибиције са специфичним брзинама раста контролних култура током истог периода.

Проценат инхибиције брзине раста (I_r) тада се може израчунати за сваку испитивану концентрацију (испитивану групу) према формули:

$$\%I_r = \frac{(\mu_C - \mu_t)}{\mu_C} \times 100$$

при чему:

% Ir јесте проценат инхибиције просечне специфичне брзине раста;

μ_C јесте средња вредност у μ контроли;

μ_T јесте средња вредност μ у испитиваној групи.

2.2.2. Прираст

Ефекти на прираст одређују се на основу две мерне променљиве, броја фрондова и још једне мерне променљиве (укупна површина фрондова, сува маса или свежа маса) у сваком суду за испитивање на почетку и на крају испитивања. Почетна биомаса за суву и свежу масу одређује се на основу узорка фрондова узетих из шарже која се користи за инокулацију судова за испитивање (видети одељак 1.7.3. ове методе). За сваку испитивану концентрацију и контролу израчунати средњу вредност прираста са проценом варијансе. Средњи проценат инхибиције прираста ($\%I_y$) за сваку испитивану групу може се израчунати на следећи начин:

$$\%I_y = \frac{(b_C - b_T)}{b_C} \times 100$$

при чему:

% I_y јесте проценат смањења прираста;

b_C јесте коначна биомаса умањена за почетну биомасу контролне групе;

b_T јесте коначна биомаса умањена за почетну биомасу испитиване групе.

2.2.3. Приказ кривих концентрација – одговор

Треба приказати криве концентрација-одговор из којих је видљив однос средњег процента инхибиције променљиве одговора (I_r или I_y израчунат како је приказано у одељку 2.2.1. или у одељку 2.2.2. ове методе) и логаритамске концентрације испитиване супстанце.

2.2.4. Процена EC_x

Процене EC_x (нпр. EC_{50}) се заснивају и на просечној специфичној брзини раста (E_rC_x) и на прирасту (E_yC_x), а оне опет на броју фрондова и још једној мерној променљивој (укупна површина фрондова, сува маса или свежа маса). То је стога што неке испитиване супстанце не утичу једнако на број фрондова и на друге мерне променљиве. Одабрани параметри токсичности су стога четири вредности EC_x за сваки израчунати ниво инхибиције x: E_rC_x (број фрондова); E_rC_x (укупна површина фрондова, сува маса или свежа маса); E_yC_x (број фрондова) и E_yC_x (укупна површина фрондова, сува маса или свежа маса).

2.4. СТАТИСТИЧКИ ПОСТУПЦИ

Циљ је да се добије квантитативни однос концентрација-одговор регресионом анализом. Ако се изврши линеарна трансформација података одговора – нпр. у јединице пробит, логит или Вејбуловог модела[16] – може се извршити пондерисана линеарна регресија; ипак, предност се даје поступцима нелинеарне регресије, које боље решавају проблем неизбежних неправилности података и одступања од правилних расподела. Приближавањем нултој или потпуној инхибицији те неправилности могу трансформацијом и додатно да се повећају и тако отежају анализу[16]. Стандардне аналитичке методе које користе пробит, логит или Вибулове трансформације намењене су кванталним подацима (нпр. смртност или преживљавање) и посебно се прилагођавају да би се могле применити на податке о брзини раста или прирасту. Конкретни поступци за одређивање вредности EC_x из континуираних података дати су у литератури[17,18,19].

За сваку променљиву одговора која се анализира израчунати процене тачака за вредности EC_x на основу односа концентрација – одговор. По могућству, за све процене одредити границе поузданости 95%. Ваљаност подударања података одговора са регресионим моделом процењује се графички или статистички. Регресиону анализу вршити на основу појединачних одговора у понављањима, а не на основу средњих вредности испитиваних група.

Ако расположиви регресиони модели/методи нису подесни за податке, процене EC_{50} и границе поузданости могу се добити и линеарном интерполацијом са методом поновног узорковања са понављањем (bootstrapping)[20].

За процену LOEC, а тиме и NOEC, потребно је упоредити средње вредности обрада применом техника анализе варијансе (у даљем тексту: ANOVA). Затим средњу вредност за сваку концентрацију упоредити са контролном средњом вредношћу применом одговарајуће методе вишеструког поређења или испитивања тренда. Овде може бити користан Данетов или Вилијамсов тест[21,22,23,24]. Треба проверити да ли је претпоставка хомогености варијанси ANOVA реална. Процена се може извршити графички или формалним тестом[25]. Погодни су Левенеов и Бартлетов тест. Ако претпоставка хомогености варијанси није задовољена, то се понекад може исправити логаритамском трансформацијом података. Ако је хетерогеност варијансе превелика да би се могла исправити трансформацијом, размотрити могућност анализе методама као што су Јонкхереови „step-down" тестови тренда. Додатне смернице за одређивање NOEC дате су у литератури[19].

Новија научна сазнања довела су до препоруке да се појам NOEC напусти и замени проценама тачака EC_x добијених регресијом. За ово испитивање са *Lemna sp.* није утврђена одређена вредност x. Међутим, изгледа да је распон од 10% до 20% одговарајући (зависно од одабране променљиве одговора), а пожељно је да се наведу обе вредности, EC_{10} и EC_{20}.

3. ИЗВЕШТАВАЊЕ

3.1. ИЗВЕШТАЈ О ИСПИТИВАЊУ

Извештај о испитивању садржи податке о:

1) Испитиваној супстанци:

– агрегатно стање и физичко-хемијска својства, укључујући границу растворљивости у води,

– подаци за идентификацију хемикалије (нпр. CAS број), укључујући чистоћу.

2) Испитиваној врсти:

– научни назив, клон (ако је познат) и извор.

3) Условима испитивања:

– поступак испитивања (статички, полустатички или проточни)

– датум почетка и трајање испитивања,

– подлога за испитивање,

– опис поставке испитивања: судови за испитивање и поклопци, запремине раствора, број колонија и фрондова по суду за испитивање на почетку испитивања,

– испитиване концентрације (номиналне односно измерене, по потреби) и број понављања по концентрацији,

– начини припреме радних и испитиваних раствора, укључујући коришћење растварача односно средстава за диспергovање,

– температура током испитивања,

– извор светлости, интензитет светла и хомогеност,

– pH вредности испитиваних и контролних подлога,

– концентрације испитиване супстанце и аналитички метод са одговарајућим подацима за оцену квалитета (валидациона истраживања, стандардне девијације или границе поузданости анализа),

– методи одређивања броја фрондова и других мерних променљивих, нпр. сува маса, свежа маса или површина фрондова,

– сва одступања од ове методе испитивања,

4) Резултатима:

– необрађени резултати: број фрондова и друге мерне променљиве у сваком испитиваном и контролном суду код сваког посматрања и анализе,

– средње вредности и стандардне девијације свих мерних променљивих,

– криве раста за сваку концентрацију (по могућству са логаритамски трансформисаном мерном променљивом, видети одељак 2.2.1. ове методе),

– време удвостручења/брзина раста у контроли на основу броја фрондова,

– израчунате променљиве одговора за свако понављање у обрадама, укључујући средње вредности и коефицијент варијације за понављања,

– графички приказ односа концентрација/ефекат,

– процене праћених параметара токсичности за променљиве одговора, нпр. EC_{50}, EC_{10}, EC_{20} и одговарајући интервали поверења; Ако се израчунавају, LOEC и/или NOEC, њихове вредности и статистичке методе које су употребљене за одређивање,

– ако се користи ANOVA, величина ефекта који се може утврдити (нпр. најмања значајна разлика),

– свака стимулација раста у било којој обради,

– сви видљиви знаци фитотоксичности и запажања у испитиваним растворима,

– тумачење резултата, укључујући могући утицај одступања од методе испитивања на резултате испитивања.

4. ЛИТЕРАТУРА

1. OECD TG 221 (2006) Lemna Sp. Growth Inhibition Test.

2. The use of Lemna studies for coloured substances is detailed in Section 13.5.3 of the EU Manual of Decisions dated July 2006, at http://ecb.jrc.ec.europa.eu/new-chemicals

3. Guidance on information requirements and chemical safety assessment – Chapter R.7b: Endpoint specific guidance; Table 7.8.3 Summary of difficult substance testing issues, available at: http://guidance.echa.europa.eu/docs/guidance_document/information_requirements_en.htm?time=1234958685#A

4. ASTM International. (2003). Standard Guide for Conducting Static Toxicity Test With Lemna gibba G3. E 1415-91 (Reapproved 1998). pp. 733-742. In, Annual Book of ASTM Standards, Vol. 11.05 Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides, ASTM, West Conshohocken, PA.

5. USEPA – United States Environmental Protection Agency. (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using Lemna spp., Public draft. EPA 712-C-96-156. 8pp.

6. AFNOR – Association Française de Normalisation. (1996). XP T 90-337: Détermination de l'inhibition de la croissance de Lemna minor. 10pp.

7. SSI – Swedish Standards Institute. (1995). Water quality – Determination of growth inhibition (7-d) Lemna minor, duckweed. SS 02 82 13. 15pp. (in Swedish).

8. Environment Canada. (1999). Biological Test Method: Test for Measuring the Inhibition of Growth Using the Freshwater Macrophyte, Lemna minor. EPS 1/RM/37-120 pp.

9. Environment Canada. (1993) Proposed Guidelines for Registration of Chemical Pesticides: Non-Target Plant Testing and Evaluation. Canadian Wildlife Service, Technical Report Series No. 145.

10. Sims I., Whitehouse P., and Lacey R. (1999). The OECD Lemna Growth Inhibition Test. Development and Ring-testing of draft OECD Test Guideline. R&D Technical Report EMA 003. WRc plc – Environment Agency.

11. OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No 23.

12. ISO DIS 20079. Water Quality – Determination of the Toxic Effect of Water Constituents and Waste Water to Duckweed (Lemna minor) – Duckweed Growth Inhibition Test.

13. Walbridge C. T. (1977). A flow-through testing procedure with duckweed (Lemna minor L.). Environmental Research Laboratory – Duluth, Minnesota 55804. US EPA Report No. EPA-600/3-77 108. September 1977.

14. Lockhart W. L., Billeck B. N. and Baron C. L. (1989). Bioassays with a floating plant (Lemna minor) for effects of sprayed and dissolved glyphosate. Hydrobiologia, 118/119, 353-359.

15. Huebert, D.B. and Shay J.M. (1993). Considerations in the assessment of toxicity using duckweeds. Environmental Toxicology and Chemistry, 12, 481-483.

16. Christensen, E.R., Nyholm, N. (1984): Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves. Env. Sci. Technol. 19, 713-718.

17. Nyholm, N. Sørensen, P.S., Kusk, K.O. and Christensen, E.R. (1992): Statistical treatment of data from microbial toxicity tests. Environ. Toxicol. Chem. 11, 157-167.

18. Bruce R.D. and Versteeg D.J. (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Environmental Toxicology and Chemistry, 11, 1485-1494.

19. OECD. (2004). Guidance Document on Statistical Analysis of Ecotoxicity Data.

20. Norberg-King T.J. (1988). An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach. National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88. USEPA, Duluth, MN.

21. Dunnett, C.W. (1955). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statist. Assoc., 50, 1096-1121.

22. Dunnett, C.W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20, 482-491.

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

24. Williams, D.A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics, 28: 510-531.

25. Brain P. and Cousens R. (1989). An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses. Weed Research, 29, 93-96.

Део други

ДОДАТАК 1.

Опис *Lemna spp.*

Водена биљка позната под називом сочивица, *Lemna spp.*, припада породици *Lemnaceae*, у коју се убрајају различите врсте распрострањене широм света које су подељене у четири рода. Њихов изглед и таксономија су исцрпно описани[1,2]. *Lemna gibba* и *L. minor* су представници умереног климатског појаса и врло често се користе у токсиколошким испитивањима. Обе врсте имају плутајућу или потопљену дискоидну стабљику (фронд) и врло танак корен који избија из средине наличја фронда. *Lemna spp.* ретко цветају, а биљке се вегетативно размножавају стварањем нових фрондова[3]. У поређењу са старијим биљкама, млађе биљке су углавном блеђе, имају краће корење и састоје се од два до три фронда различите величине. Биљке сочивице су веома погодне за лабораторијска испитивања захваљујући малој величини, једноставној грађи, бесполном размножавању и кратком времену генерације[4,5].

Због вероватних разлика у осетљивости међу врстама валидна су само поређења осетљивости унутар исте врсте.

Примери врста рода *Lemna* које су коришћене у испитивањима: референтни списак

Lemna aequinoctialis: Eklund, B. (1996). The use of the red alga Ceramium strictum and the duckweed Lemna aequinoctialis in aquatic ecotoxicological bioassays. Licentiate in Philosophy Thesis 1996:2. Dep. of Systems Ecology, Stockholm University.

Lemna major: Clark, N. A. (1925). The rate of reproduction of Lemna major as a function of intensity and duration of light. J. phys. Chem., 29: 935-941.

Lemna minor: United States Environmental Protection Agency (USEPA). (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using Lemna spp., Public draft. EPA 712-C-96-156. 8pp.

Association Française de Normalisation (AFNOR). (1996). XP T 90-337: Détermination de l'inhibition de la croissance de *Lemna minor*. 10pp.

Swedish Standards Institute (SIS). (1995). Water quality – Determination of growth inhibition (7-d) Lemna minor, duckweed. SS 02 82 13. 15pp. (in Swedish).

Lemna gibba: ASTM International. (2003). Standard Guide for Conducting Static Toxicity Test With Lemna gibba G3. E 1415-91 (Reapproved 1998). pp. 733-742.

United States Environmental Protection Agency (USEPA). (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using Lemna spp., Public draft. EPA 712-C-96-156. 8pp.

Lemna paucicostata: Nasu, Y., Kugimoto, M. (1981). Lemna (duckweed) as an indicator of water pollution. I. The sensitivity of Lemna paucicostata to heavy metals. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 10:1959-1969.

Lemna perpusilla: Clark, J. R. et al. (1981). Accumulation and depuration of metals by duckweed (Lemna perpusilla). Ecotoxicol. Environ. Saf., 5:87-96.

Lemna trisulca: Huebert, D. B., Shay, J. M. (1993). Considerations in the assessment of toxicity using duckweeds. Environ. Toxicol. and Chem., 12:481-483.

Lemna valdiviana: Hutchinson, T.C., Czyrska, H. (1975). Heavy metal toxicity and synergism to floating aquatic weeds. Verh.-Int. Ver. Limnol., 19:2102-2111.

Извори врста рода *Lemna*

University of Toronto Culture Collection of Algae and Cyanobacteria

Department of Botany, University of Toronto

Toronto, Ontario, Canada, M5S 3 B2

Tel. +1-416-978-3641

Fax +1-416-978-5878

e-mail: jacreman@botany.utoronto.ca

http://www.botany.utoronto.ca/utcc

North Carolina State University

Forestry Dept

Duckweed Culture Collection

Campus Box 8002

Raleigh, NC 27695-8002

СЈЕДИЊЕНЕ АМЕРИЧКЕ ДРЖАВЕ

Tel. 001 (919) 515-7572

astomp@unity.ncsu.edu

Institute of Applied Environmental Research (ITM) Stockholm University

SE-106 91 Stockholm

ШВЕДСКА

Tel. +46 86747240

Fax +46 86747636

Federal Environmental Agency (UBA)

FG III 3.4

Schichauweg 58

12307 Berlin

НЕМАЧКА

e-mail: lemna@uba.de

http://www.umweltbundesamt.de/contact.htm

Литература

1. Hillman, W.S. (1961). The Lemnaceae or duckweeds: A review of the descriptive and experimental literature. The Botanical Review, 27:221-287.

2. Landolt, E. (1986). Biosystematic investigations in the family of duckweed (Lemnaceae). Vol. 2. Geobotanischen Inst. ETH, Stiftung Rubel, Zürich, Switzerland.

3. Björndahl, G. (1982). Growth performance, nutrient uptake and human utilization of duckweeds (Lemnaceae family). ISBN 82-991150-0-0. The Agricultural Research Council of Norway, University of Oslo.

4. Wang, W. (1986). Toxicity tests of aquatic pollutants by using common duckweed. Environmental Pollution, Ser B, 11:1-14.

5. Wang, W. (1990). Literature review on duckweed toxicity testing. Environmental Research, 52:7-22.

ДОДАТАК 2.
Одржавање радне културе

Радне културе се на нижој температури (4 °C до 10 °C) могу дуже време држати без пресејавања. Као хранљива подлога за радне културе *Lemna* може се користити подлога која се користи у испитивању, али могуће је користити и друге подлоге богате хранљивим материјама.

Одређени број младих светлозелених биљака се повремено премешта у нове судове за узгајање са свежом подлогом применом асептичких поступака. У хладнијим условима, какви се овде препоручују, пресађивање се може вршити у размацима до три месеца.

Користе се хемијски чисти (очишћени киселином) и стерилни стаклени судови за узгајање, а код руковања се примењују асептички поступци. Ако дође до загађења радне културе нпр. алгама или гљивицама, предузети потребне мере за уклањање загађујућих организама. У случају алги и већине других загађујућих организама, то се може постићи површинском стерилизацијом. Узме се узорак загађеног биљног материјала и одсече корење. Материјал се затим снажно протресе у чистој води и урони у 0,5%-тни (v/v) раствор натријум хипохлорита, 30 секунди до 5 минута. Биљни материјал се затим испере

стерилном водом и пренесе у више шаржи у судове за узгајање које садрже свежу хранљиву подлогу. У овом поступку многи листови ће угинути, нарочито код дужег времена излагања, али неки од преживелих потребно је да буду незагађени. Они се затим поново могу користити за инокулисање нових култура.

ДОДАТАК 3.
Подлоге

За врсте *L. minor* и *L. gibba* препоручују се различите хранљиве подлоге. За *L. minor* се препоручује прилагођена варијанта подлоге према шведском стандарду (SIS), а за *L. gibba* подлога 20X AAP. Састав обе подлоге дат је у даљем тексту. Код припреме ових подлога користити хемикалије чистоће PA („pro analysis”) односно хемикалије аналитичке чистоће и дејонизовану воду.

Хранљива подлога за врсте рода *Lemna* према шведском стандарду (SIS)

Радни раствори I-V се стерилишу обрадом у аутоклаву (120° C, 15 минута) или мембранском филтрацијом (величина пора око 0,2 μm).

Раствор VI (и опционо VII) се стерилишу искључиво мембранском филтрацијом; они се не смеју стерилисати у аутоклаву.

Стерилни радни раствори се чувају на хладном и мрачном месту. Радне растворе I-V бацити након шест месеци, док раствори VI (и опционо VII) имају рок употребе 1 месец.

Табела

Радни раствор бр.	Супстанца	Концен-трација у радном раствору ($g \cdot l^{-1}$)	Концен-трација у припремљеној подлози ($mg \cdot l^{-1}$)	Припремљена подлога	
				Елемент	Концен-трација ($mg \cdot l^{-1}$)
I	$NaNO_3$	8,50	85	Na; N	32; 14
	KH_2PO_4	1,34	13,4	K; P	6,0; 2,4
II	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	15	75	Mg; S	7,4; 9,8
III	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	7,2	36	Ca; Cl	9,8; 17,5
IV	Na_2CO_3	4,0	20	C	2,3
V	H_3BO_3	1,0	1,00	B	0,17
	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0,20	0,20	Mn	0,056
	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,010	0,010	Mo	0,0040
	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,050	0,050	Zn	0,011
	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,0050	0,0050	Cu	0,0013
	$Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	0,010	0,010	Co	0,0020
VI	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0,17	0,84	Fe	0,17
	Na_2-EDTA$\cdot 2H_2O$	0,28	1,4	–	–
VII	MOPS (пуфер)	490	490	–	–

Да би се добио један литар подлоге SIS, у 900 ml дејонизоване воде дода се:

– 10 ml радног раствора 1

– 5 ml радног раствора II

– 5 ml радног раствора III

– 5 ml радног раствора IV

– 1 ml радног раствора V

– 5 ml радног раствора VI

– 1 ml радног раствора VII (опционо)

Напомена: Код неких супстанци потребан је још један радни раствор VII (пуфер MOPS) (видети последњи став у одељку

1.4. ове методе).

pH вредност се подеси на 6,5 ± 0,2 помоћу 0,1 или 1 mol HCl или NaOH, и допуни дејонизованом водом до запремине од једног литра.

Хранљива подлога 20X AAP

Радни раствори се припремају у стерилној дестилованој или дејонизованој води.

Стерилни радни раствори се чувају на хладном и мрачном месту. У тим условима радни раствори ће имати рок употребе најмање 6 до 8 недеља.

За подлогу 20X – AAP припремити пет радних раствора са хранљивим материјама (A1, A2, A3, B и C) користећи реагенсно чисте хемикалије. Хранљива подлога се добија тако што се у приближно 850 ml дејонизоване воде дода по 20 ml сваког од радних раствора са хранљивим материјама. - pH вредност се подеси на 7,5 ± 0,1 помоћу 0,1 или 1 mol HCl или NaOH, и допуни дејонизованом водом до запремине од једног литра. Затим се подлога профилтрира у стерилну посуду кроз мембрански филтер (приближно) 0,2 mm.

Хранљиву подлогу за испитивање припремити 1–2 дана пре употребе како би се стабилизовала pH вредност. pH вредност хранљиве подлоге проверити пре употребе и према потреби подесити додавањем 0,1 или 1 M NaOH или HCl како је наведено у горњем тексту.

Табела

Радни раствор бр.	Супстанца	Концентра-ција у радном раствору ($g \cdot l^{-1}$)*	Концентра-ција у припремљеној подлози ($mg \cdot l^{-1}$)*	Припремљена подлога	
				Елемент	Концентра-ција ($mg \cdot l^{-1}$)*
A1	$NaNO_3$	26	510	Na; N	190; 84
	$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	12	240	Mg	58,08
	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	4,4	90	Ca	24,04
A2	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	15	290	S	38,22
A3	$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	1,4	30	K; P	9,4;3,7
B	H_3BO_3	0,19	3,7	B	0,65
	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0,42	8,3	Mn	2,3
	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0,16	3,2	Fe	0,66
	$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	0,30	6,0	–	–
	$ZnCl_2$	3,3 $mg \cdot l^{-1}$	66 $\mu g \cdot l^{-1}$	Zn	31 $\mu g \cdot l^{-1}$
	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	1,4 $mg \cdot l^{-1}$	29 $\mu g \cdot l^{-1}$	Co	7,1 $\mu g \cdot l^{-1}$
	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	7,3$mg \cdot l^{-1}$	145 $\mu g \cdot l^{-1}$	Mo	58 $\mu g \cdot l^{-1}$
	$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0,012 $mg \cdot l^{-1}$	0,24 $\mu g \cdot l^{-1}$	Cu	0,080 $\mu g \cdot l^{-1}$
C	$NaHCO_3$	15	300	Na; C	220; 43

Напомена: Теоретски одговарајућа коначна концентрација бикарбоната (којом се избегавају значајнија подешавања pH вредности) је 15 mg/l, а не 300 mg/l. Претходна искуства с употребом подлоге 20X-AAP, укључујући међународно међулабораторијско испитивање за ову методу, заснивају се на 300 mg/l. (I. Sims, P. Whitehouse and R. Lacey. (1999) The OECD Lemna Growth Inhibition Test. Development and Ring-testing of draft OECD Test Guideline. R & D Technical Report EMA 003. WRc plc – Environment Agency.

*Ако није другачије наведено

Подлога ШТАЈНБЕРГ (према стандарду ISO 20079)

Концентрације и радни раствори

Модификована подлога Штајнберг је у стандарду ISO 20079 предвиђена само за *Lemna minor* (будући да је тамо једино и дозвољена врста *Lemna minor*), али испитивања су показала да се и са врстом *Lemna gibba* могу постићи добри резултати.

Код припреме ове подлоге користити хемикалије чистоће PA („pro analysis" односно хемикалије аналитичке чистоће и дејонизовану воду.

Хранљива подлога се припрема из радних раствора или 10-струко концентрисане подлуге како би се добила максимална концентрација подлоге која се може постићи без таложења.

Табела 1. pH-стабилизована подлога ШТАЈНБЕРГ
(варијанта према Алтенбургеру)

Супстанца		Хранљива подлога	
Макроелементи	моларна маса	mg/l	mmol/l
KNO_3	101,12	350,00	3,46
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	236,15	295,00	1,25
KH_2PO_4	136,09	90,00	0,66
K_2HPO_4	174,18	12,60	0,072
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	246,37	100,00	0,41
Микроелементи	моларна маса	µg/l	µmol/l
H_3BO_3	61,83	120,00	1,94
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	287,43	180,00	0,63
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	241,92	44,00	0,18
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	197,84	180,00	0,91
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	270,21	760,00	2,81
EDTA динатријум дихидрат	372,24	1500,00	4,03

Табела 2. Радни раствори (макроелементи)

1. Макроелементи (50-струко концентрисано)	g/l
Радни раствор 1: KNO_3 KH_2PO_4 K_2HPO_4	17,50 4,5 0,63
Радни раствор 2: $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	5,00
Радни раствор 3: $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	14,75

Табела 3. Радни раствори (микроелементи)

2. Микроелементи (1000-струко концентрисано)	mg/l
Радни раствор 4: H_3BO_3	120,0
Радни раствор 5: $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	180,0
Радни раствор 6:	44,0

$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	
Радни раствор 7: $MnCl_2 \cdot 4H_2O$	180,0
Радни раствор 8: $FeCl_3 \cdot 6H_2O$	760,00
EDTA динатријум дихидрат	1500,00

Радни раствори 2 и 3 могу се објединити, као и радни раствори 4-7 (узимајући у обзир тражене концентрације).

За дужи рок употребе радне растворе обрадити у аутоклаву 20 минута на температури од 121°C или извршити стерилну филтрацију (0,2 µm). За радни раствор 8 у сваком случају се препоручује стерилна филтрација (0,2 µm).

Припрема коначне концентрација подлоге ШТАЈНБЕРГ (модификована)

20 ml радних раствора 1, 2 и 3 (видети Табелу 2) дода се у око 900 ml дејонизоване воде како би се избегло таложење;

Дода се 1,0 ml радних раствора 4, 5, 6, 7 и 8 (видети Табелу 3);

pH вредност да буде 5,5 ± 0,2 (подесити додавањем минималне запремине раствора NaOH или HCl);

Допуни се водом до 1000 ml;

Ако су радни раствори стерилисани и користи се одговарајућа вода, није потребна додатна стерилизација. Ако се стерилизација врши на коначној подлози, радни раствор 8 додати након обраде у аутоклаву (20 минута на 121 °C).

Припрема 10-струко концентрисане подлоге ШТАЈНБЕРГ (модификована) за међускладиштење

20 ml радних раствора 1, 2 и 3 (видети Табелу 2) дода се у око 30 ml воде како би се избегло таложење;

Дода се 1,0 ml радних раствора 4, 5, 6, 7 и 8 (видети Табелу 3);

Допуни се водом до 100 ml;

Ако су радни раствори стерилисани и користи се одговарајућа вода, није потребна додатна стерилизација. Ако се стерилизација врши на коначној подлози, радни раствор 8 додати након обраде у аутоклаву (20 минута на 121°C);

pH вредност подлоге (коначна концентрација) да буде 5,5 ± 0,2.