

II

(Akty o charakterze nieustawodawczym)

ROZPORZĄDZENIA

ROZPORZĄDZENIE KOMISJI (UE) NR 260/2014

z dnia 24 stycznia 2014 r.

zmieniające, w celu dostosowania do postępu technicznego, rozporządzenie (WE) nr 440/2008 ustalające metody badań zgodnie z rozporządzeniem (WE) nr 1907/2006 Parlamentu Europejskiego i Rady w sprawie rejestracji, oceny, udzielania zezwoleń i stosowanych ograniczeń w zakresie chemikaliów (REACH)

(Tekst mający znaczenie dla EOG)

KOMISJA EUROPEJSKA,

uwzględniając Traktat o funkcjonowaniu Unii Europejskiej,

uwzględniając rozporządzenie (WE) nr 1907/2006 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 18 grudnia 2006 r. w sprawie rejestracji, oceny, udzielania zezwoleń i stosowanych ograniczeń w zakresie chemikaliów (REACH), utworzenia Europejskiej Agencji Chemikaliów, zmieniające dyrektywę 1999/45/WE oraz uchylające rozporządzenie Rady (EWG) nr 793/93 i rozporządzenie Komisji (WE) nr 1488/94, jak również dyrektywę Rady 76/769/EWG i dyrektywy Komisji 91/155/EWG, 93/67/EWG, 93/105/WE i 2000/21/WE⁽¹⁾, w szczególności jego art. 13 ust. 3,

a także mając na uwadze, co następuje:

- (1) Rozporządzenie Komisji (WE) nr 440/2008⁽²⁾ zawiera metody badań służące określaniu właściwości fizykochemicznych, toksyczności oraz ekotoksyczności substancji, które to metody należy stosować do celów rozporządzenia (WE) nr 1907/2006.
- (2) Należy uaktualnić rozporządzenie (WE) nr 440/2008 w celu uwzględnienia w pierwszej kolejności nowych i uaktualnionych alternatywnych metod badań przyjętych niedawno przez OECD, w celu zmniejszenia liczby zwierząt wykorzystywanych do celów doświadczalnych, zgodnie z dyrektywą Parlamentu Europejskiego i Rady 2010/63/UE z dnia 22 września 2010 r. w sprawie

ochrony zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych⁽³⁾ oraz dyrektywą Rady 86/609/EWG z dnia 24 listopada 1986 r. w sprawie zbliżenia przepisów ustawowych, wykonawczych i administracyjnych państw członkowskich dotyczących ochrony zwierząt wykorzystywanych do celów doświadczalnych i innych celów naukowych⁽⁴⁾.

- (3) Dostosowanie zawiera dwie metody oznaczania właściwości fizykochemicznych, w tym aktualizację metody badawczej oznaczania rozpuszczalności w wodzie oraz nową metodę badawczą z wykorzystaniem współczynnika podziału, mającą zastosowanie do oceny substancji trwałych, zdolnych do bioakumulacji oraz toksycznych (PBT); cztery nowe i jedną zaktualizowaną metodę oznaczania ekotoksyczności oraz losów i zachowania w środowisku; dziewięć metod oznaczania toksyczności i innych skutków dla zdrowia obejmujących cztery metody badawcze w zakresie toksyczności inhalacyjnej, w tym aktualizację trzech metod i jedną nową metodę mającą na celu zmniejszenie liczby wykorzystywanych zwierząt i poprawienie oceny wyników, aktualizację metody 28-dniowego badania toksyczności doustnej wywołanej powtarzaniem dawkowaniem w celu włączenia do niej parametrów do oceny zaburzenia funkcjonowania układu hormonalnego, aktualizację metody badawczej w zakresie toksykokinetyki w odniesieniu do projektowania i zrozumienia badań toksykologicznych oraz aktualizację metod badawczych w zakresie toksyczności przewlekłej, rakotwórczości oraz łączonej toksyczności przewlekłej i rakotwórczości.
- (4) Należy zatem odpowiednio zmienić rozporządzenie (WE) nr 440/2008.
- (5) Środki przewidziane w niniejszym rozporządzeniu są zgodne z opinią komitetu ustanowionego na mocy art. 133 rozporządzenia (WE) nr 1907/2006,

⁽¹⁾ Dz.U. L 396 z 30.12.2006, s. 1.

⁽²⁾ Dz.U. L 142 z 31.5.2008, s. 1.

⁽³⁾ Dz.U. L 276 z 20.10.2010, s. 33.

⁽⁴⁾ Dz.U. L 358 z 18.12.1986, s. 1.

PRZYJMUJE NINIEJSZE ROZPORZĄDZENIE:

Artykuł 1

Załącznik do rozporządzenia (WE) nr 440/2008 zostaje zmieniony zgodnie z załącznikiem do niniejszego rozporządzenia.

Artykuł 2

Niniejsze rozporządzenie wchodzi w życie trzeciego dnia po jego opublikowaniu w *Dzienniku Urzędowym Unii Europejskiej*.

Niniejsze rozporządzenie wiąże w całości i jest bezpośrednio stosowane we wszystkich państwach członkowskich.

Sporządzono w Brukseli dnia 24 stycznia 2014 r.

W imieniu Komisji
José Manuel BARROSO
Przewodniczący

ZAŁĄCZNIK

W załączniku do rozporządzenia (WE) nr 440/2008 wprowadza się następujące zmiany:

1) rozdział A.6 otrzymuje brzmienie:

„A.6. ROZPUSZCZALNOŚĆ W WODZIE

WPROWADZENIE

1. Niniejsza metoda badawcza jest równoważna metodzie opisanej w dotyczącej badań wytycznej OECD nr 105 (OECD TG 105) (1995). Niniejsza metoda badawcza stanowi zmienioną wersję pierwotnej metody opisanej w OECD TG 105, przyjętej w 1981 r. Pomiedzy aktualną wersją a wersją z 1981 r. nie ma zasadniczych różnic. Zmiany dotyczyły przede wszystkim formatu. Przegląd był oparty o metodę badawczą UE »Water solubility« (Rozpuszczalność w wodzie) ⁽¹⁾.

ZAŁOŻENIA WSTĘPNE

2. Na rozpuszczalność substancji w wodzie w sposób istotny może wpłynąć obecność zanieczyszczeń. Niniejsza metoda badawcza dotyczy oznaczania rozpuszczalności w wodzie substancji zasadniczo czystych, które w wodzie są stabilne i nie mają charakteru lotnego. Przed oznaczeniem rozpuszczalności w wodzie przydatne jest posiadanie pewnych wstępnych informacji na temat substancji badanej, takich jak wzór strukturalny, ciśnienie pary, stała dysocjacji i hydroliza jako funkcja pH.
3. W niniejszym opisie metody badawczej podano dwie metody: metodę wymywania, służącą do oznaczania rozpuszczalności niższej niż 10^{-2} g/l, i metodę wytrząsania w kolbie, służącą do wyznaczania rozpuszczalności wyższej. Opisano również proste badanie wstępne. Umożliwia ono wyznaczenie w przybliżeniu odpowiedniej ilości próbki, jaka ma być użyta w ostatecznym badaniu, jak również czasu niezbędnego do uzyskania roztworu nasyconego.

DEFINICJE I JEDNOSTKI

4. Rozpuszczalność substancji w wodzie jest to stężenie masowe substancji w nasyconym roztworze wodnym w określonej temperaturze.
5. Rozpuszczalność w wodzie wyraża się jako masę substancji rozpuszczonej na objętość roztworu. Jednostką w układzie SI jest kg/m^3 , można również stosować jednostkę g/l.

SUBSTANCJE ODNIESIENIA

6. Nie ma konieczności stosowania substancji odniesienia przy określaniu rozpuszczalności substancji badanej.

OPIS METOD

Warunki badania

7. Najkorzystniej jest przeprowadzić badanie w temperaturze $20 \pm 0,5$ °C. Wybrana temperatura powinna być utrzymywana na stałym poziomie we wszystkich istotnych częściach sprzętu.

Badanie wstępne

8. Stosowana jest procedura sekwencyjna. Do ok. 0,1 g próbki (substancje stałe należy sproszkować) znajdującej się w cylindrze miarowym o pojemności 10 ml, zamkniętym korkiem szklanym, dodaje się w temperaturze pokojowej kolejne jednostki objętości wody. Po każdym dodaniu jednostki wody mieszaninę wstrząsa się przez 10 minut i kontroluje wzrokowo pod kątem jakichkolwiek nierozpuszczonych części próbki. Jeżeli po dodaniu 10 ml wody próbka lub jej część pozostają nierozpuszczone, doświadczenie kontynuuje się przy użyciu cylindra miarowego o objętości 100 ml. Przybliżoną rozpuszczalność podano w tabeli 1 poniżej pod taką objętością wody, w jakiej dochodzi do pełnego rozpuszczenia próbki. Jeżeli rozpuszczalność jest mała, do rozpuszczenia substancji badanej może być potrzebne dużo czasu i należy ją pozostawić na co najmniej 24 godziny. Jeżeli po 24 godzinach substancja badana pozostaje nierozpuszczona, należy ją pozostawić na dłużej (do 96 godzin) lub poczynić próbę dalszego rozcieńczenia w celu stwierdzenia, czy należy zastosować metodę wymywania, czy metodę wytrząsania w kolbie.

Tabela 1

| | | | | | | | |
|--|---------|-----------|---------|--------|-------|------|-------|
| ml wody na 0,1 g substancji rozpuszczalnej | 0,1 | 0,5 | 1 | 2 | 10 | 100 | > 100 |
| Przybliżona rozpuszczalność w g/l | > 1 000 | 1 000–200 | 200–100 | 100–50 | 50–10 | 10–1 | < 1 |

Metoda wymywania

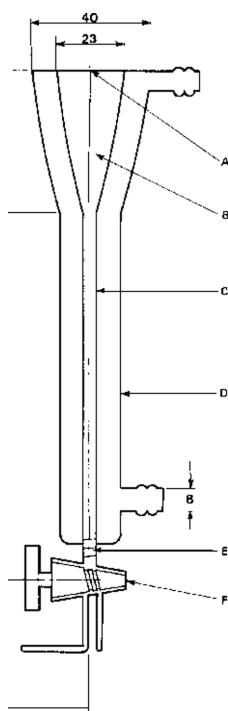
Zasady ogólne

9. Niniejsza metoda jest oparta na wymywaniu wodą substancji badanej z mikrokolumny wypełnionej obojętnym nośnikiem pokrytym uprzednio nadmiarem badanej substancji (2). Rozpuszczalność w wodzie podawana jest jako stężenie masowe eluatu po osiągnięciu wartości plateau w funkcji czasu.

Przyrząd

10. Przyrząd składa się z mikrokolumny (rysunek 1) utrzymywanej w stałej temperaturze. Połączona jest ona z pompą recyrkulacyjną (rysunek 2) lub z naczyniem poziomującym (rysunek 3). Mikrokolumna zawiera obojętny nośnik utrzymywany na miejscu małą zatyczką z waty szklanej, która służy także do odfiltrowania cząstek. Jako nośnik można zastosować szklane kulki, ziemię okrzemkową lub inny obojętny materiał.
11. Mikrokolumna przedstawiona na rysunku 1 nadaje się do zestawu z pompą recyrkulacyjną. W górnej części kolumny znajduje się przestrzeń mieszcząca pięć objętości złoża (ilość usuwaną na początku doświadczenia) i pięć próbek (pobieranych do analizy podczas doświadczenia). Alternatywnie jej rozmiar może być zmniejszony, jeżeli do układu można dodawać wody podczas doświadczenia w celu zastąpienia pięciu objętości złoża usuniętych wraz z zanieczyszczeniami. Kolumna jest połączona rurką z obojętnego materiału z pompą recyrkulacyjną o wydajności około 25 ml/godz. Pompa recyrkulacyjna może być na przykład pompą perystaltyczną lub membranową. Należy uważać, aby nie doszło do zanieczyszczenia lub adsorpcji na materiale rurki.
12. Schematyczny układ obejmujący naczynie poziomujące przedstawiono na rysunku 3. W tym przypadku mikrokolumna wyposażona jest w zawór jednostronnie odcinający. Podłączenie do naczynia poziomującego składa się ze szlifowanego złącza szklanego i rurki z obojętnego materiału. Prędkość wypływu z naczynia poziomującego powinna wynosić w przybliżeniu 25 ml/godz.

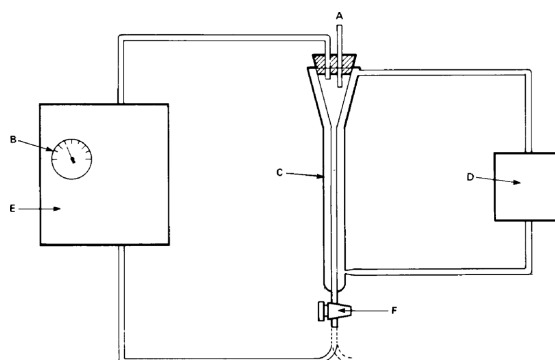
Rysunek 1



Wymiary w mm

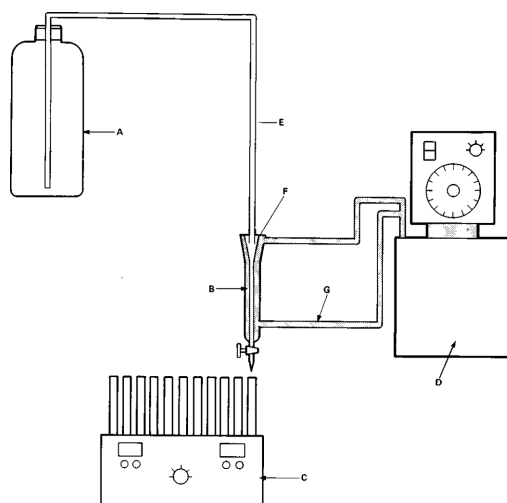
- A. Połączenie szlifowanego złącza szklanego
- B. Przestrzeń nadpowierzchniowa
- C. Wewnętrz 5
- D. Zewnętrz 19
- E. Zatyczka z waty szklanej
- F. Zawór odcinający

Rysunek 2



- A. Wyrównywanie ciśnienia do atmosferycznego
- B. Przepływomierz
- C. Mikrokolumna
- D. Pompa cyrkulacyjna kontrolowana termostatycznie
- E. Pompa recyrkulacyjna
- F. Zawór dwudrożny do próbkowania

Rysunek 3



- A. Naczynie poziomujące (np. 2,5-litrowa kolba)
 - B. Kolumna
 - C. Odbiornik frakcji
 - D. Termostat
 - E. Rurka teflonowa
 - F. Szlifowane złącze szklane
 - G. Linia wodna (pomiędzy termostatem i kolumną, średnica wewnętrzna około 8 mm)
13. Około 600 mg materiału nośnika przenieść do kolby okrągłodennej o pojemności 50 ml. Stosowną ilość substancji badanej rozpuścić w lotnym rozpuszczalniku o czystości analitycznej i dodać odpowiednią ilość tego roztworu do nośnika. Rozpuszczalnik poddać całkowitemu odparowaniu, np. w wyparce obrotowej, ponieważ w innym razie nośnik nie zostanie całkowicie nasycony wodą podczas etapu wymywania z powodu podziału faz na powierzchni nośnika. Upakowany nośnik pozostawić do nasączenia na dwie godziny w około 5 ml wody, a następnie zawiesinę wlać do mikrokolumny. Alternatywnie można wsypać suchy, upakowany nośnik do mikrokolumny wypełnionej wodą i pozostawić na dwie godziny do ustalenia stanu równowagi.

14. Upakowanie nośnika może stwarzać problemy prowadzące do błędnych wyników, np. jeżeli substancja badana osadza się jako olej. Problemy te należy zbadać, a szczegóły zamieścić w sprawozdaniu.

Procedura z zastosowaniem pompy recyrkulacyjnej

15. Uruchomić przepływ przez kolumnę. Zalecane jest stosowanie szybkości przepływu około 25 ml/godz. – odpowiada to 10 objętościom złoża na godzinę dla opisanej tu kolumny. Odrzucić co najmniej pięć pierwszych wypełnień złoża w celu usunięcia rozpuszczalnych w wodzie zanieczyszczeń. Następnie uruchomić pompę aż do uzyskania równowagi, definiowanej poprzez wyniki pomiarów dla pięciu kolejnych próbek, w których stężenie nie różni się o więcej niż $\pm 30\%$ przy losowym rozkładzie różnic. Próbki te powinny zostać od siebie oddzielone w odstępach czasowych odpowiadających przejściu eluentu w ilości co najmniej dziesięciokrotnej objętości złoża. W zależności od zastosowanej metody analitycznej lepszą metodą może być wykreślenie krzywej zależności stężenia od czasu w celu wykazania osiągnięcia stanu równowagi.

Procedura z zastosowaniem naczynia poziomującego

16. Zebrać kolejne frakcje eluatu i wykonać analizę wybraną metodą. Do oznaczenia rozpuszczalności wykorzystuje się frakcje ze środkowego zakresu eluatu, gdzie stężenia są stałe w granicach $\pm 30\%$ w co najmniej pięciu kolejnych frakcjach.
17. Preferowanym eluentem jest woda podwójnie destylowana. Można również użyć wody zdejonizowanej o rezystywności powyżej 10 M Ω /cm i całkowitej zawartości węgla organicznego poniżej 0,01 %.
18. W obu procedurach wykonuje się drugą serię pomiarów przy połowie prędkości przepływu zastosowanej w pierwszej serii. Jeżeli wyniki obu serii są zgodne, badanie należy uznać za zadowalające. Jeżeli zmierzona rozpuszczalność przy niższej prędkości przepływu jest większa, wtedy należy powtarzać procedurę zmniejszania tej prędkości o połowę tak długo, dopóki w dwóch kolejnych seriach nie uzyska się takiej samej rozpuszczalności.
19. W obu procedurach należy kontrolować frakcje pod kątem obecności zawiesin koloidalnych przez sprawdzenie, czy nie występuje efekt Tyndalla. Obecność takich cząstek powoduje nieważność badania i po poprawieniu działania filtrującego kolumny należy je powtórzyć.
20. Należy zmierzyć pH każdej próbki, najlepiej przy użyciu specjalnych pasków wskaźnikowych.

Metoda wytrząsania w kolbie

Zasady ogólne

21. Substancję badaną (ciała stałe muszą zostać sproszkowane) rozpuścić w wodzie w temperaturze nieco wyższej od temperatury badania. Po uzyskaniu nasycenia mieszaninę schłodzić i utrzymywać w temperaturze badania. Alternatywnie, jeżeli za pomocą właściwego pobierania próbek upewniono się co do osiągnięcia stanu równowagi nasycenia, pomiar może być wykonywany bezpośrednio w temperaturze badania. Następnie przy pomocy odpowiedniej metody analitycznej oznaczyć stężenie masowe substancji badanej w roztworze wodnym, który nie może zawierać żadnych nierozpuszczonych cząstek (3).

Przyrząd

22. Potrzebne są następujące materiały:

- zwykłe szkło laboratoryjne i instrumenty,
- urządzenie służące do mieszania roztworów w kontrolowanej, stałej temperaturze,
- o ile jest potrzebna w przypadku emulsji – wirówka (najlepiej z termostatem), oraz
- sprzęt do wykonywania analiz.

Procedura

23. Na podstawie badania wstępnego oszacować ilość substancji badanej niezbędną do nasycenia pożądanej objętości wody. Odważyć około pięciokrotność tej ilości do każdego z trzech naczyń szklanych wyposażonych w korki szklane (np. probówek wirówkowych, kolb). Do każdego naczynia dodać pewną objętość wody zależną od wybranej metody analitycznej i zakresu rozpuszczalności. Następnie mocno zatkać korkiem naczynia wytrząsać w temperaturze 30 °C. Należy użyć wytrząsarki lub mieszarki, która może działać w stałej temperaturze, np. mieszadła magnetycznego w łaźni wodnej z temperaturą kontrolowaną termostatem. Po jednym dniu jedno z naczyń pozostawić do ustalenia stanu równowagi na 24 godziny w temperaturze badania, przy czym od czasu do czasu należy je wstrząsnąć. Zawartość naczynia poddać następnie wirowaniu w temperaturze badania i oznaczyć stężenie substancji badanej w klarownej fazie wodnej za pomocą odpowiedniej metody analitycznej. Z pozostałymi dwiema kolbami postąpić podobnie po początkowym ustaleniu stanu równowagi w temperaturze

30 °C przez, odpowiednio, dwa i trzy dni. Jeżeli wyniki oznaczenia stężenia w co najmniej dwóch ostatnich naczyniach nie różnią się o więcej niż 15 %, badanie należy uznać za zadowalające. Jeżeli wyniki dla naczyń 1, 2 i 3 wykazują tendencję do wzrastających wartości, całe badanie należy powtórzyć, stosując dłuższe okresy ustalania równowagi.

24. Badanie można również wykonać bez wstępnej inkubacji w 30 °C. W celu oceny szybkości ustalania się równowagi nasycenia próbki pobiera się do momentu, gdy czas mieszania nie wywiera już wpływu na mierzone stężenie.
25. Należy zmierzyć pH każdej próbki, najlepiej przy użyciu specjalnych pasków wskaźnikowych.

Oznaczenia analityczne

26. Najkorzystniejsza jest metoda specyficzna dla substancji, gdyż małe ilości rozpuszczalnych zanieczyszczeń mogą spowodować duże błędy wyników pomiarów rozpuszczalności. Przykładami takich metod są: chromatografia gazowa lub cieczowa, miareczkowanie, fotometria, woltamperometria.

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Dane

Metoda wymywania

27. W każdej serii należy obliczyć wartość średnią i odchylenie standardowe dla co najmniej pięciu kolejnych próbek pobranych przy plateau nasycenia. Wartości średnie uzyskane w dwóch badaniach przy różnych prędkościach przepływu nie powinny się różnić o więcej niż 30 %.

Metoda wytrząsania w kolbie

28. Wyniki pomiarów dla każdej z trzech kolb, które nie powinny się różnić o więcej niż 15 %, uśrednia się.

Sprawozdanie z badania

Metoda wymywania

29. Sprawozdanie z badania musi zawierać następujące informacje:

- wyniki badania wstępnego,
- nazwa chemiczna i informacje o zanieczyszczeniach (oczyszczanie wstępne, jeżeli zostało przeprowadzone),
- stężenia, prędkości przepływu i pH dla każdej próbki,
- średnie i odchylenia standardowe dla co najmniej pięciu próbek przy plateau nasycenia dla każdej serii,
- średnia z co najmniej dwóch kolejnych serii,
- temperatura wody w czasie procesu nasycania,
- metoda analityczna,
- charakter nośnika,
- opakowanie nośnika,
- zastosowany rozpuszczalnik,
- dowody niestabilności chemicznej substancji w trakcie badania,
- wszystkie informacje istotne dla interpretacji wyników, szczególnie w odniesieniu do zanieczyszczeń i stanu fizycznej substancji badanej.

Metoda wytrząsania w kolbie

30. Sprawozdanie z badania musi zawierać następujące informacje:

- wyniki badania wstępnego,
- nazwa chemiczna i informacje o zanieczyszczeniach (oczyszczanie wstępne, jeżeli zostało przeprowadzone),

- poszczególne oznaczenia analityczne, a w przypadku gdy dla każdej kolby była oznaczana więcej niż jedna wartość, ich średnia,
- pH każdej próbki,
- średnia wartości dla różnych kolb, które były zgodne,
- temperatura badania,
- metoda analityczna,
- dowody na jakąkolwiek niestabilność chemiczną substancji w trakcie badania,
- wszystkie informacje istotne dla interpretacji wyników, szczególnie w odniesieniu do zanieczyszczeń i stanu fizycznego substancji badanej.

BIBLIOGRAFIA:

- (1) Dyrektywa Komisji 92/69/EWG z dnia 31 lipca 1992 r. dostosowująca po raz siedemnasty do postępu technicznego dyrektywę 67/548/EWG w sprawie zbliżenia przepisów ustawowych, wykonawczych i administracyjnych odnoszących się do klasyfikacji i etykietowania substancji niebezpiecznych (Dz.U. L 383 z 29.12.1992, s. 113).
 - (2) NF T 20-045 (AFNOR) (September 1985). Chemical products for industrial use – Determination of water solubility of solids and liquids with low solubility – Column elution method.
 - (3) NF T 20-046 (AFNOR) (September 1985). Chemical products for industrial use – Determination of water solubility of solids and liquids with high solubility – Flask method.”;
- 2) dodaje się rozdział A.23 w brzmieniu:

„A.23. WSPÓŁCZYNNIK PODZIAŁU (1-OKTANOL/WODA): METODA POWOLNEGO MIESZANIA

WPROWADZENIE

1. Niniejsza metoda badawcza jest równoważna metodzie opisanej w dotyczącej badań wytycznej OECD nr 123 (2006). Wartości współczynnika podziału 1-oktanol/woda (P_{OW}) aż do $\log P_{OW} = 8,2$ wyznaczono w sposób dokładny za pomocą metody powolnego mieszania (1). Jest to zatem podejście eksperymentalne odpowiednie do bezpośredniego wyznaczania P_{OW} dla silnie hydrofobowych substancji.
2. Inne metody wyznaczania współczynnika podziału 1-oktanol/woda (P_{OW}) to metoda wytrząsania w kolbie (2) oraz wyznaczanie P_{OW} za pomocą badania retencji w wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) z odwróconymi fazami (3). Metoda wytrząsania w kolbie jest podatna na artefakty związane z przechodzeniem mikrokropelek oktanolu do fazy wodnej. W miarę wzrostu P_{OW} obecność tych kropelek w fazie wodnej prowadzi do coraz większego przeszacowywania stężenia substancji badanej w wodzie. Zastosowanie metody jest zatem ograniczone do substancji o $\log P_{OW} < 4$. Druga metoda oparta jest na wiarygodnych, bezpośrednio wyznaczonych wartościach P_{OW} , które służą do kalibracji zależności pomiędzy retencją w HPLC a mierzonymi wartościami P_{OW} . Dostępny był projekt wytycznych OECD w sprawie wyznaczania współczynników podziału 1-oktanol/woda dla substancji podatnych na dysocjację (4), ale nie należy już z nich korzystać.
3. Niniejszą metodę badawczą opracowano w Niderlandach. Precyzja opisanej tutaj metody została zwalidowana i zoptymalizowana w międzylaboratoryjnym badaniu walidacyjnym, w którym brało udział 15 laboratoriów (5).

ZAŁOŻENIA WSTĘPNE

Znaczenie i zastosowanie

4. Wykazano, że dla obojętnych substancji organicznych występuje bardzo istotna zależność pomiędzy współczynnikiem podziału 1-oktanol/woda (P_{OW}) a ich bioakumulacją w rybach. Wykazano ponadto, że P_{OW} jest skorelowany z toksycznością dla ryb, jak również z sorpcją substancji chemicznych przez ciała stałe takie jak gleby i osady. Wyczerpujący przegląd tych zależności znajduje się w pozycji literaturowej (6).

5. Określono wiele różnorodnych zależności pomiędzy współczynnikiem podziału 1-oktanol/woda a innymi właściwościami substancji mającymi znaczenie dla toksykologii i chemii środowiska. W rezultacie współczynnik podziału 1-oktanol/woda stał się kluczowym parametrem w szacowaniu ryzyka stosowania chemikaliów dla środowiska, jak również w przewidywaniu losów chemikaliów w środowisku.

Zakres

6. Doświadczenie oparte na powolnym mieszaniu w założeniach ma na celu ograniczenie tworzenia mikrokropelek 1-oktanolu w fazie wodnej. W rezultacie nie dochodzi do przeszacowania stężenia w roztworze wodnym będącego skutkiem obecności cząsteczek substancji badanej w takich kropelkach. Metoda powolnego mieszania nadaje się zatem szczególnie do wyznaczania P_{OW} dla substancji, dla których oczekiwana wartość $\log P_{OW}$ wynosi 5 i więcej i dla których metoda wytrząsania w kolbie (2) może dawać błędne wyniki.

DEFINICJA I JEDNOSTKI

7. Współczynnik podziału substancji między wodę a rozpuszczalnik lipofilowy (1-oktanol) jest miarą podziału w stanie równowagi danej substancji między dwie fazy. Współczynnik podziału między wodę a 1-oktanol (P_{OW}) definiuje się jako stosunek stężeń w stanie równowagi substancji badanej w 1-oktanolu nasyconym wodą (C_O) i w wodzie nasyconej 1-oktanołem (C_W).

$$P_{OW} = C_O/C_W$$

Jako stosunek stężeń jest to wielkość bezwymiarowa. Najczęściej podawana jest w formie logarytmu dziesiętnego ($\log P_{OW}$). Współczynnik P_{OW} zależy od temperatury i podawane dane powinny obejmować temperaturę pomiaru.

ZASADA METODY

8. Aby wyznaczyć współczynnik podziału, ustala się stan równowagi dla wody, 1-oktanolu i substancji badanej zmieszanych ze sobą w stałej temperaturze. Następnie wyznacza się stężenia substancji badanej w obu fazach.
9. W proponowanym tutaj doświadczeniu metodą powolnego mieszania można ograniczyć problemy związane z tworzeniem mikrokropelek w doświadczeniu metodą wytrząsania w kolbie. W doświadczeniu metodą powolnego mieszania stan równowagi dla wody, 1-oktanolu i substancji badanej ustala się w reaktorze z termostatem, w którym zachodzi mieszanie. Przyspiesza ono wymianę pomiędzy fazami. Mieszanie wprowadza niewielkie turbulencje zwiększające stopień wymiany między 1-oktanołem a wodą bez tworzenia mikrokropelek (1).

ZAKRES ZASTOSOWANIA METODY BADANIA

10. Ponieważ na współczynnik aktywności substancji badanej może wpłynąć obecność innych substancji, należy badać substancję w formie czystej. Do wyznaczania współczynnika podziału 1-oktanol/woda należy użyć substancji o największym stopniu czystości, jaka jest dostępna w handlu.
11. Niniejsza metoda ma zastosowanie do substancji czystych, które nie ulegają dysocjacji ani asocjacji i nie wykazują znaczącej aktywności na granicy faz. Metodę można stosować do wyznaczania współczynnika podziału 1-oktanol/woda takich substancji oraz mieszanin. W przypadku stosowania tej metody do mieszanin wyznaczone współczynniki podziału 1-oktanol/woda są warunkowe i zależą od składu chemicznego badanej mieszaniny oraz od składu elektrolitowego fazy wodnej. Metodę można również zastosować, pod warunkiem podjęcia dodatkowych kroków, do związków dysocjujących lub asocjujących (pkt 12).
12. Ponieważ przy podziale substancji dysocjujących, takich jak kwasy organiczne i fenole oraz zasady organiczne i związki metaloorganiczne, w wodzie i 1-oktanolu występuje wiele stanów równowagi, współczynnik podziału 1-oktanol/woda jest w takich przypadkach stałą warunkową, której wartość jest silnie zależna od składu elektrolitowego (7) (8). Wyznaczenie współczynnika podziału 1-oktanol/woda wymaga zatem kontrolowania i podania w sprawozdaniu wartości pH oraz składu elektrolitowego podczas doświadczenia. Do oceny tych współczynników podziału wymagana jest specjalistyczna wiedza. Na podstawie stałej (stałych) dysocjacji należy wybrać odpowiednie wartości pH, takie, aby wyznaczyć współczynnik podziału dla każdego stopnia jonizacji. Przy badaniu związków metaloorganicznych wymagane jest stosowanie takich substancji buforowych, które nie tworzą kompleksów (8). Należy dobrać warunki doświadczenia, uwzględniając aktualny stan wiedzy na temat chemii roztworów wodnych (stałych trwałości kompleksów, stałych dysocjacji), w taki sposób, aby można było oszacować specjację chemiczną substancji badanej w fazie wodnej. Należy zapewnić identyczną moc jonową we wszystkich doświadczeniach poprzez zastosowanie elektrolitu podstawowego.
13. Przy badaniu substancji o bardzo małej rozpuszczalności w wodzie lub wysokim P_{OW} mogą pojawić się problemy w związku ze stężeniami substancji w wodzie tak niskimi, że ich dokładne oznaczenie będzie trudne. Niniejsza metoda badawcza obejmuje wytyczne w zakresie rozwiązywania tego problemu.

INFORMACJE NA TEMAT SUBSTANCJI BADANEJ

14. Należy stosować odczynniki czyste do analizy lub o wyższej klasie czystości. Zaleca się stosowanie niezakwaszonych substancji badanych o znanym składzie chemicznym i preferowanej czystości co najmniej 99 % lub znakowanych izotopowo substancji badanych o znanym składzie chemicznym i czystości radiochemicznej. W przypadku użycia znacznika o krótkim czasie połowicznego rozpadu należy zastosować poprawki na rozpad. W przypadku substancji badanych znakowanych izotopowo należy zastosować specyficzną chemicznie metodę analityczną w celu zagwarantowania, że mierzona promieniotwórczość jest bezpośrednio związana z substancją badaną.
15. Oszacowanie $\log P_{OW}$ można uzyskać za pomocą dostępnego w handlu oprogramowania do szacowania $\log P_{OW}$ lub też przy pomocy stosunku rozpuszczalności w obu rozpuszczalnikach.
16. Przed wyznaczeniem P_{OW} metodą powolnego mieszania powinny być znane następujące informacje na temat substancji badanej:
- wzór strukturalny;
 - metody analityczne odpowiednie do oznaczenia stężenia danej substancji w wodzie i w 1-oktanolu;
 - stała (stałe) dysocjacji substancji podatnych na dysocjację (wytyczna OECD nr 112 (9));
 - rozpuszczalność w wodzie (10);
 - hydroliza abiotyczna (11);
 - szybka biodegradowalność (12);
 - prężność pary (13).

OPIS METODY

Wyposażenie i przyrząd

17. Wymagane jest standardowe wyposażenie laboratoryjne, w szczególności następujące sprzęty:
- mieszadła magnetyczne i pokryte teflonem mieszadła magnetyczne służące do mieszania fazy wodnej,
 - instrumenty analityczne odpowiednie do oznaczania stężenia substancji badanej na oczekiwanych poziomach stężenia,
 - naczynie do mieszania z zaworem w dolnej części. W zależności od oszacowania $\log P_{OW}$ i granicy wykrywalności (LOD) związku badanego należy rozważyć zastosowanie naczynia reakcyjnego o takiej samej geometrii i pojemności większej niż litr, tak aby można było uzyskać wystarczającą objętość wody do celów ekstrakcji i analizy chemicznej. Dzięki temu uzyskane zostanie wyższe stężenie w wyciągu wodnym i oznaczenie analityczne będzie bardziej wiarygodne. Tabela z podanymi oszacowaniami minimalnej potrzebnej objętości, LOD dla danego związku, szacowanej dla niego wartości $\log P_{OW}$ oraz rozpuszczalności w wodzie znajduje się w dodatku 1. Dane w tabeli podano na podstawie zależności pomiędzy $\log P_{OW}$ a stosunkiem rozpuszczalności w oktanolu i wodzie zgodnie z publikacją Pisuwan *et al.* (14):

$$\log P_{OW} = 0,88 \log SR + 0,41$$

gdzie:

$SR = S_{oct}/S_w$ (wyrażone jako stężenia molowe);

oraz podanej przez Lymana (15) zależności pozwalającej przewidywać rozpuszczalność w wodzie. Rozpuszczalność w wodzie obliczoną według równania podanego w dodatku 1 trzeba traktować jako pierwsze oszacowanie. Należy zauważyć, że użytkownik ma swobodę w szacowaniu rozpuszczalności w wodzie dowolną metodą, którą uznaje się za lepsze odzwierciedlenie zależności między hydrofobowością a rozpuszczalnością. W przypadku związków stałych zaleca się na przykład uwzględnienie temperatury topnienia w przewidywaniu rozpuszczalności. Jeżeli stosuje się równanie zmodyfikowane, należy się upewnić, czy równanie służące do obliczania rozpuszczalności w oktanolu nadal jest poprawne. Schematyczny rysunek naczynia z płaszczem szklanym do termostatowania z mieszadłem, o objętości ok. 1 litra znajduje się w dodatku 2. Proporcje naczynia przedstawionego w dodatku 2 okazały się korzystne i należy je utrzymać w przypadku używania przyrządu o innych rozmiarach,

- podczas doświadczenia wykonywanego metodą powolnego mieszania konieczny jest sprzęt do utrzymywania temperatury na stałym poziomie.

18. Naczynia powinny być wykonane z obojętnego materiału, tak aby efekt adsorpcji na powierzchni naczynia był nieznaczący.

Przygotowanie roztworów do badania

19. Wyznaczenie P_{OW} należy przeprowadzać przy użyciu 1-oktanolu o najwyższej czystości, jaka jest dostępna w handlu (co najmniej +99 %). Zaleca się oczyszczanie 1-oktanolu poprzez ekstrakcję kwasem, zasadą i wodą, a następnie osuszenie. Do oczyszczania 1-oktanolu można ponadto zastosować destylację. Oczyszczony 1-oktanol służy do przygotowania standardowych roztworów substancji badanych. Woda wykorzystywana w wyznaczeniu P_{OW} powinna być destylowana w destylatorze szklanym lub wykonanym ze szkła kwarcowego, bądź uzyskana z układu oczyszczania, można też użyć wody o czystości HPLC. W przypadku wody destylowanej wymagane jest filtrowanie przez filtr 0,22 μm , należy także przeprowadzić ślepe próby w celu sprawdzenia, czy w stężonych ekstraktach nie ma zanieczyszczeń, które mogą wpływać na substancję badaną. W przypadku gdy stosowany jest filtr z włókna szklanego, należy go oczyścić poprzez wypalanie przez co najmniej trzy godziny w temperaturze 400 °C.
20. Oba rozpuszczalniki przed wykonaniem doświadczenia powinny zostać wzajemnie nasycone w drodze ustalania stanu równowagi w wystarczająco dużym naczyniu. Stan równowagi osiąga się poprzez powolne mieszanie układu dwufazowego przez dwa dni.
21. Wybrać odpowiednie stężenie substancji badanej i rozpuścić substancję w 1-oktanolu (nasyconym wodą). Należy wyznaczyć współczynnik podziału 1-oktanol/woda w rozcieńczonych roztworach w 1-oktanolu oraz w wodzie. Stężenie substancji badanej nie powinno zatem przekraczać 70 % jej rozpuszczalności, przy stężeniu w obu fazach wynoszącym maksymalnie 0,1 M (1). Roztwory w 1-oktanolu używane w doświadczeniu muszą być wolne od zawiesziny nierozpuszczonych cząstek substancji badanej.
22. Odpowiednią ilość substancji badanej rozpuścić w 1-oktanolu (nasyconym wodą). Jeżeli szacowana wartość $\log P_{OW}$ przekracza 5, należy dopilnować, aby roztwory w 1-oktanolu używane w doświadczeniu były wolne od zawiesziny nierozpuszczonych cząstek substancji badanej. W tym celu stosuje się następującą procedurę dla chemikaliów o szacowanej wartości $\log P_{OW} > 5$:
- substancję badaną rozpuścić w 1-oktanolu (nasyconym wodą),
 - pozostawić roztwór na czas wystarczający, aby zawieszony nierozpuszczony cząstki substancji opadły na dno. Podczas osiadania monitorować stężenie substancji badanej,
 - po ustabilizowaniu się wartości mierzonych stężeń w roztworze 1-oktanolu rozcieńczyć roztwór podstawowy dodając odpowiednią objętość 1-oktanolu,
 - wykonać pomiar stężenia roztworu podstawowego. Jeżeli zmierzone stężenie odpowiada rozcieńczeniu, można użyć rozcieńczonego roztworu w doświadczeniu metodą powolnego mieszania.

Ekstrakcja i analiza próbek

23. Do oznaczenia substancji badanej należy użyć zwalidowanej metody analitycznej. Wykonujący badanie muszą wykazać, że stężenia w 1-oktanolu nasyconym wodą oraz w fazie wodnej nasyconej 1-oktanołem podczas doświadczenia przekraczają granicę oznaczalności w stosowanych metodach analitycznych. W przypadkach, w których potrzebne są metody ekstrakcji, przed doświadczeniem trzeba ustalić odzysk analityczny substancji badanej z fazy wodnej i 1-oktanolu. Sygnały analityczne należy skorygować o ślepe próbę i dopilnować, aby nie było możliwe przeniesienie analitu z jednej próbki do innej.
24. Przed analizą może być potrzebna ekstrakcja fazy wodnej za pomocą rozpuszczalnika organicznego oraz wstępne zatężanie ekstraktu w związku z dość niskimi stężeniami hydrofobowych substancji badanych w fazie wodnej. Z tego samego powodu konieczne jest zmniejszenie stężeń dla ewentualnych ślepych prób. W tym celu trzeba stosować rozpuszczalniki o wysokiej czystości, najlepiej rozpuszczalniki do analizy pozostałości. W uniknięciu zanieczyszczeń krzyżowych może ponadto pomóc używanie starannie wyczyszczonego sprzętu szklanego (np. mytego w rozpuszczalniku lub wypalanego w podwyższonej temperaturze).
25. Oszacowanie $\log P_{OW}$ można uzyskać z programu służącego do szacowania lub na podstawie specjalistycznej wiedzy. Jeżeli oszacowana wartość przekracza 6, należy bliżej przyjrzeć się korektom o ślepe próbę oraz przeniesieniu analitu. W przypadku gdy oszacowana wartość $\log P_{OW}$ jest większa od 6, obowiązkowe jest również zastosowanie wzorca zastępczego do określenia korekty o odzysk, tak aby można było uzyskać wysoki współczynnik zatężenia wstępnego. W handlu dostępnych jest szereg programów komputerowych służących do szacowania $\log P_{OW}$ (1), np. Clog P (16), KOWWIN (17), ProLogP (18) czy ACD log P (19). Opis metod szacowania można znaleźć w pozycjach literaturowych (20–22).

(1) Informacje te podano tylko dla wygody użytkowników. Można korzystać z innych, równoważnych programów komputerowych, jeżeli da się wykazać, że wyniki obliczeń są takie same.

26. Granice oznaczalności (LOQ) dla oznaczania substancji badanej w 1-oktanolu i w wodzie ustalić zatwierdzonymi metodami. Zasadniczo za granicę oznaczalności danej metody można przyjąć takie stężenie w wodzie lub 1-oktanolu, dla którego stosunek sygnału do szumu wynosi 10. Należy wybrać odpowiednią metodę ekstrakcji i zateżania wstępnego, a także określić odzysk analityczny. Aby otrzymać sygnał o odpowiedniej mocy, przy oznaczaniu analitycznym wybiera się odpowiedni współczynnik zateżania wstępnego.
27. Na podstawie parametrów metody analitycznej i oczekiwanych stężeń wyznaczyć przybliżoną wielkość próbki potrzebnej do dokładnego oznaczenia stężenia związku. Należy unikać używania próbek fazy wodnej zbyt małych, aby uzyskać wystarczający sygnał analityczny. Nie należy również stosować nadmiernie dużych próbek fazy wodnej, ponieważ mogłoby pozostać zbyt mało wody, aby przeprowadzić wymaganą minimalną liczbę analiz ($n = 5$). W dodatku 1 minimalna objętość próbki podana jest jako funkcja objętości naczynia, granicy wykrywalności substancji badanej i jej rozpuszczalności.
28. Ilościowego oznaczenia substancji badanych dokonuje się poprzez porównanie z krzywymi kalibracyjnymi dla odpowiedniego związku chemicznego. Wartości stężeń w analizowanych próbkach muszą mieścić się pomiędzy wartościami stężeń wzorców.
29. W przypadku substancji badanych o szacowanej wartości $\log P_{OW}$ przekraczającej 6 przed ekstrakcją należy dodać do próbki fazy wodnej wzorec zastępczy w celu rejestracji strat zachodzących podczas ekstrakcji i wstępnego zateżania próbek fazy wodnej. Dla dokładnego obliczenia korekty o odzysk wzorce zastępcze muszą mieć właściwości bardzo zbliżone do substancji badanej lub z nią identyczne. Do tego celu najlepiej jest użyć analogów danej substancji (trwale) znakowanych izotopowo (np. deuterowanych w maksymalnym stopniu lub znakowanych ^{13}C). Jeżeli nie jest możliwe zastosowanie znakowanych izotopów trwałych, tj. ^{13}C lub 2H , należy za pomocą wiarygodnych danych literaturowych wykazać, że właściwości fizykochemiczne substancji zastępczej są bardzo bliskie właściwościom substancji badanej. Przy ekstrakcji ciecz-ciecz z fazy wodnej mogą powstawać emulsje. Można to ograniczyć poprzez dodanie soli i pozostawienie emulsji na noc, aby osiadła. Metody ekstrakcji i wstępnego zateżania próbek trzeba podać w sprawozdaniu.
30. próbki pobrane z fazy 1-oktanolu można w razie potrzeby rozcieńczyć odpowiednim rozpuszczalnikiem przed analizą. Ponadto zaleca się użycie wzorca zastępczego do obliczenia korekty o odzysk w przypadku substancji, dla których wyniki doświadczeń z odzyskiem wykazały dużą zmienność (względne odchylenie standardowe $> 10\%$).
31. Szczegóły metody analitycznej trzeba zamieścić w sprawozdaniu. Obejmuje to metodę ekstrakcji, współczynniki wstępnego zateżania i rozcieńczania, parametry przyrządów, procedurę kalibracji, zakres kalibracji, odzysk analityczny substancji badanej z wody, dodawanie wzorców zastępczych w celu obliczenia korekty o odzysk, wartości ślepych prób, granice wykrywalności i granice oznaczalności.

Wykonanie badania

Optymalny stosunek objętości 1-oktanol/woda

32. Przy dobieraniu odpowiednich objętości wody i 1-oktanolu należy uwzględnić LOQ w 1-oktanolu i wodzie, współczynniki zateżania wstępnego stosowane do próbek wody, objętości próbek pobranych z fazy 1-oktanolu i wody oraz oczekiwane stężenia. Dla ułatwienia doświadczenia należy wybrać taką objętość 1-oktanolu w układzie powolnego mieszania, aby warstwa 1-oktanolu miała grubość wystarczającą ($> 0,5$ cm) do pobierania próbek z fazy 1-oktanolu bez jej naruszania.
33. Typowe objętości faz stosowane przy oznaczaniu związków o $\log P_{OW}$ równych 4,5 i więcej to 20–50 ml 1-oktanolu i 950–980 ml wody w naczyniu jednolitrowym.

Warunki badania

34. W trakcie badania za pomocą termostatu ustalić temperaturę w naczyniu reakcyjnym tak, aby ograniczyć wahania temperatury do wartości poniżej $1\text{ }^{\circ}C$. Oznaczenie należy przeprowadzić w temperaturze $25\text{ }^{\circ}C$.
35. Układ doświadczalny należy chronić przed światłem słonecznym poprzez przeprowadzanie doświadczenia w ciemnym pomieszczeniu albo przykrycie naczynia reakcyjnego folią aluminiową.
36. Doświadczenie należy przeprowadzać w środowisku wolnym od pyłu (w jak największym stopniu).
37. Układ 1-oktanol-woda mieszać aż do osiągnięcia stanu równowagi. W doświadczeniu pilotażowym ocenia się długość okresu ustalania stanu równowagi poprzez przeprowadzenie doświadczenia metodą powolnego mieszania i okresowe pobieranie próbek wody oraz 1-oktanolu. Probki należy pobierać nie częściej niż co pięć godzin.
38. Każda procedura wyznaczania P_{OW} musi obejmować co najmniej trzy niezależne doświadczenia metodą powolnego mieszania.

Wyznaczanie czasu ustalania stanu równowagi

39. Przyjmuje się, że stan równowagi jest ustalony wtedy, gdy krzywa regresji stosunku stężeń w 1-oktanolu/wodzie względem czasu przez cztery punkty czasowe ma nachylenie nieróżniące się znacznie od zera przy granicznym poziomie istotności równym 0,05. Minimalny czas ustalania równowagi przed rozpoczęciem pobierania próbek to jeden dzień. Z reguły pobieranie próbek substancji o szacowanej wartości $\log P_{OW}$ mniejszej niż 5 można przeprowadzić na drugi i trzeci dzień. W przypadku związków bardziej hydrofobowych może zajść konieczność wydłużenia czasu ustalania równowagi. Dla związku o $\log P_{OW} = 8,23$ (dekachlorobifenyl) do ustalenia stanu równowagi wystarczyły 144 godziny. Stan równowagi ocenia się poprzez powtarzanie pobierania próbek z pojedynczego naczynia.

Rozpoczynanie doświadczenia

40. Na początku doświadczenia napełnić naczynie reakcyjne wodą nasyconą 1-oktanołem. Należy pozostawić układ na czas wystarczający do osiągnięcia temperatury ustalonej za pomocą termostatu.
41. Do naczynia reakcyjnego ostrożnie dodać pożądaną ilość substancji badanej (rozpuszczoną w wymaganej ilości 1-oktanolu nasyconego wodą). Jest to kluczowy etap doświadczenia, ponieważ konieczne jest uniknięcie gwałtownego zmieszania obu faz. W tym celu fazę 1-oktanolową można powoli podawać pipetą na ściankę naczynia, blisko powierzchni wody. Roztwór spłynie wzdłuż szklanej ścianki i utworzy film na powierzchni fazy wodnej. Należy zawsze unikać wlewania 1-oktanolu bezpośrednio do naczynia – krople 1-oktanolu nie powinny wpadać bezpośrednio do wody.
42. Po rozpoczęciu mieszania jego prędkość należy powoli zwiększać. Jeżeli nie da się odpowiednio wyregulować silników mieszadła, należy rozważyć zastosowanie transformatora. Prędkość mieszania należy wyregulować tak, aby powstał wir na styku wody i 1-oktanolu, o głębokości od 0,5 do maksymalnie 2,5 cm. Prędkość mieszania należy zmniejszyć, jeśli grubość wiru przekroczy 2,5 cm; w przeciwnym razie z kropelek 1-oktanolu w fazie wodnej mogą powstać mikrokropelki, co może spowodować przeszacowanie stężenia substancji badanej w wodzie. Maksymalną prędkość mieszania powodującą powstanie 2,5 cm wiru zaleca się na podstawie wyników międzylaboratoryjnego badania walidacyjnego (5). Jest to kompromis pomiędzy szybkim ustalaniem równowagi a zapobieganiem tworzeniu mikrokropelek 1-oktanolu.

Pobieranie i przygotowywanie próbek

43. Przed pobieraniem próbek mieszadło należy wyłączyć i pozostawić układ, aż płyny znieruchomieją. Po ukończeniu pobierania próbek uruchomić mieszadło ponownie na wolnych obrotach, jak opisano powyżej, i stopniowo zwiększa się prędkość mieszania.
44. Próbkę fazy wodnej pobiera się przez zawór znajdujący się w dolnej części naczynia reakcyjnego. Należy zawsze odrzucać objętość martwą wody znajdującą się w kranach (dla naczynia przedstawionego w dodatku 2 jest to około 5 ml). Woda w kranach nie ulega mieszaniu, a zatem nie znajduje się w równowadze z całym układem. Należy odnotować objętość próbek wody i upewnić się, że przy ustalaniu bilansu masy wzięto pod uwagę ilość substancji badanej obecnej w odrzuconej wodzie. Należy minimalizować straty związane z parowaniem poprzez umożliwienie spokojnego przepływu wody do rozdzielacza, tak aby warstwa styku wody/1-oktanolu pozostała nienaruszona.
45. Próbkę fazy 1-oktanolu uzyskuje się poprzez pobranie małej podwielokrotnej części (ok. 100 μ l) z warstwy 1-oktanolu za pomocą strzykawki o objętości 100 mikrolitrów wykonanej wyłącznie ze szkła i metalu. Należy uważać, aby nie naruszyć warstwy styku rozpuszczalników. Objętość pobranej cieczy jest zapisywana. Wystarczy mała podwielokrotność, ponieważ próbka fazy 1-oktanolu będzie rozcieńczana.
46. Należy unikać zbędnych etapów polegających na przenoszeniu próbki. W tym celu objętość próbki należy wyznaczyć grawimetrycznie. W przypadku próbek fazy wodnej można to uzyskać poprzez pobieranie próbki roztworu do rozdzielacza, który zawiera już potrzebną objętość rozpuszczalnika.

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

47. Zgodnie z niniejszą metodą badawczą P_{OW} wyznacza się, wykonując trzy doświadczenia metodą powolnego mieszania (w trzech jednostkach doświadczalnych) dla badanego związku, w identycznych warunkach. Analiza metodą regresji zastosowana do wykazania, że osiągnięty został stan równowagi, powinna być oparta na wynikach co najmniej czterech oznaczeń C_O/C_W w następujących po sobie punktach czasowych. Umożliwia to obliczenie wariancji jako miary niepewności wartości średniej otrzymanej przez każdą jednostkę doświadczalną.
48. P_{OW} można określić przez wariancję danych otrzymanych dla każdej jednostki doświadczalnej. Informacje te wykorzystuje się do obliczenia P_{OW} jako średniej ważonej z wyników poszczególnych jednostek doświadczalnych. Waga jest odwrotność wariancji wyników dla jednostek doświadczalnych. W efekcie dane, dla których zmienność (wyrażana jako wariancja) jest duża, a zatem mające mniejszą wiarygodność, wpływają na wynik w mniejszym stopniu niż dane, dla których wariancja jest mała.

49. Analogicznie oblicza się ważone odchylenie standardowe. Jest ono miarą powtarzalności pomiarów P_{OW} . Niska wartość ważonego odchylenia standardowego wskazuje na to, że wyznaczenie P_{OW} w ramach jednego laboratorium dawało bardzo powtarzalne wyniki. Formalne opracowanie statystyczne danych przedstawiono w skrócie poniżej.

Opracowanie wyników

Wykazanie, że stan równowagi został osiągnięty

50. Dla każdego pobierania próbek oblicza się logarytm stosunku stężeń substancji badanej w 1-oktanolu i w wodzie ($\log(C_o/C_w)$). Osiągnięcie równowagi chemicznej wykazuje się za pomocą wykresu tego stosunku względem czasu. Plateau pojawiające się na tym wykresie dla co najmniej czterech kolejnych punktów czasowych wskazuje na osiągnięcie równowagi oraz na rzeczywiste rozpuszczenie związku w 1-oktanolu. W razie jego braku badanie trzeba kontynuować aż do momentu, gdy nachylenie dla czterech kolejnych punktów czasowych nie będzie znacząco różne od zera przy granicznym poziomie istotności równym 0,05, co wskazuje na niezależność $\log C_o/C_w$ od czasu.

Obliczanie $\log P_{OW}$

51. Wartość $\log P_{OW}$ dla jednostki doświadczalnej oblicza się jako średnią ważoną $\log C_o/C_w$ dla tej części krzywej $\log C_o/C_w$ względem czasu, dla której wykazano osiągnięcie stanu równowagi. Średnią ważoną oblicza się poprzez stosowanie do danych wag będących odwrotnością wariancji, tak aby wpływ na wynik końcowy był odwrotnie proporcjonalny do niepewności danych.

Wartość średnia $\log P_{OW}$

52. Wartość średnią $\log P_{OW}$ dla różnych jednostek doświadczalnych oblicza się jako średnią wyników dla poszczególnych jednostek doświadczalnych ważoną ich odpowiednimi wariancjami.

Obliczenie wykonuje się w następujący sposób:

$$\log P_{OW,Av} = (S w_i \times \log P_{OW,i}) \times (S w_i)^{-1}$$

gdzie:

$\log P_{OW,i}$ = wartość $\log P_{OW}$ dla jednostki doświadczalnej,

$\log P_{OW,Av}$ = średnia ważona wartości dla poszczególnych oznaczeń $\log P_{OW}$,

w_i = waga statystyczna przypisana wartości $\log P_{OW}$ dla jednostki doświadczalnej i.

Odwrotność wariancji $\log P_{OW,i}$ występuje jako w_i ($w_i = \text{var}(\log P_{OW,i})^{-1}$).

53. Błąd średniej $\log P_{OW}$ szacowany jest jako powtarzalność $\log C_o/C_w$ wyznaczanych w fazie równowagi w poszczególnych jednostkach doświadczalnych. Wyrażony jest jako ważone odchylenie standardowe $\log P_{OW,Av}$ ($\sigma_{\log P_{OW,Av}}$), które z kolei jest miarą błędu związanego z $\log P_{OW,Av}$. Ważone odchylenie standardowe można obliczyć z wariancji ważonej ($\text{var}_{\log P_{OW,Av}}$) w następujący sposób:

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

$$\sigma_{\log P_{OW,Av}} = (\text{var}_{\log P_{OW,Av}})^{0,5}$$

Symbol n oznacza liczbę jednostek doświadczalnych.

Sprawozdanie z badania

54. Sprawozdanie z badania musi zawierać następujące informacje:

Substancja badana

- nazwa zwyczajowa, nazwa chemiczna, numer CAS, wzór strukturalny (z zaznaczeniem miejsca znakowania, jeżeli używa się substancji znakowanej izotopowo) oraz istotne właściwości fizykochemiczne (zob. pkt 17),
- stopień czystości substancji badanej (zanieczyszczenia),
- czystość radiochemiczna dla znakowanych substancji chemicznych i aktywność molowa (w stosownych przypadkach),
- wstępne oszacowanie $\log P_{ow}$ oraz metoda zastosowana do wyprowadzenia tej wartości.

Warunki badania

- daty wykonywania badań,
- temperatura podczas doświadczenia,
- objętości 1-oktanolu i wody na początku badania,
- objętości pobranych próbek 1-oktanolu i wody,
- objętości 1-oktanolu i wody pozostałe w naczyniach używanych do badania,
- opis naczyń używanych do badania i zastosowanych warunków mieszania (geometria mieszadła i naczynia używanego do badania, wysokość wiru w mm oraz, jeżeli jest znana, prędkość mieszania),
- metody analityczne wykorzystane do oznaczenia substancji badanej oraz granice oznaczalności danych metod,
- czasy pobierania próbek,
- pH fazy wodnej i zastosowane substancje buforowe w przypadku regulowania pH w celu badania cząsteczek podatnych na dysocjację,
- liczba powtórzeń.

Wyniki

- powtarzalność i czułość zastosowanych metod analitycznych,
- oznaczone stężenia substancji badanej w 1-oktanolu i w wodzie w funkcji czasu,
- wykazanie bilansu masy,
- temperatura oraz odchylenie standardowe zakresu temperatur podczas doświadczenia,
- regresja stosunku stężeń względem czasu,
- średnia wartość $\log P_{ow,Av}$ i jej błąd standardowy,
- omówienie i interpretacja wyników,
- przykłady surowych danych liczbowych z reprezentatywnej analizy (wszystkie surowe dane muszą być przechowywane zgodnie ze standardami DPL), w tym odzysk substancji zastępczych oraz liczba poziomów zastosowanych w kalibracji (wraz z kryteriami dla współczynnika korelacji krzywej kalibracyjnej) oraz wyniki zapewniania jakości/kontroli jakości (QA/QC),
- jeśli jest dostępne: sprawozdanie z walidacji procedury oznaczania (wskazane wśród odnośników literaturowych).

BIBLIOGRAFIA:

- (1) De Bruijn JHM, Busser F, Seinen W, Hermens J. (1989). Determination of octanol/water partition coefficients with the «slow-stirring» method. *Environ. Toxicol. Chem.* 8: 499–512.
- (2) Rozdział A.8 niniejszego załącznika. Współczynnik podziału.
- (3) Rozdział A.8 niniejszego załącznika. Współczynnik podziału.
- (4) OECD (2000). OECD Draft Guideline for the Testing of Chemicals: 122 Partition Coefficient (n-Octanol/Water): pH-Metric Method for Ionisable Substances. Paryż.
- (5) Tolls J (2002). Partition Coefficient 1-Octanol/Water (Pow) Slow-Stirring Method for Highly Hydrophobic Chemicals, Validation Report. RIVM contract-Nrs 602730 M/602700/01.
- (6) Boethling RS, Mackay D (eds.) (2000). Handbook of property estimation methods for chemicals. Lewis Publishers Boca Raton, FL, USA.

- (7) Schwarzenbach RP, Gschwend PM, Imboden DM (1993). *Environmental Organic Chemistry*. Wiley, Nowy Jork, NY.
 - (8) Arnold CG, Widenhaupt A, David MM, Müller SR, Haderlein SB, Schwarzenbach RP (1997). Aqueous speciation and 1-octanol-water partitioning of tributyl- and triphenyltin: effect of pH and ion composition. *Environ. Sci. Technol.* 31: 2596–2602.
 - (9) OECD (1981) OECD Guidelines for the Testing of Chemicals: 112 Dissociation Constants in Water. Paris.
 - (10) Rozdział A.6 niniejszego załącznika. Rozpuszczalność w wodzie.
 - (11) Rozdział C.7 niniejszego załącznika. Rozpad – rozpad abiotyczny: hydroliza jako funkcja pH
 - (12) Rozdział C.4 – część II–VII (metody A–F) niniejszego załącznika. Oznaczenie szybkiej biodegradowalności.
 - (13) Rozdział A.4 niniejszego załącznika. Prężność pary.
 - (14) Pinsuwan S, Li A and Yalkowsky S.H. (1995). Correlation of octanol/water solubility ratios and partition coefficients, *J. Chem. Eng. Data.* 40: 623–626.
 - (15) Lyman WJ (1990). Solubility in water. W: *Handbook of Chemical Property Estimation Methods: Environmental Behavior of Organic Compounds*, Lyman WJ, Reehl WF, Rosenblatt DH, Eds. American Chemical Society, Washington, DC, 2-1 do 2-52.
 - (16) Leo A, Weininger D (1989). *Medchem Software Manual*. Daylight Chemical Information Systems, Irvine, CA.
 - (17) Meylan W (1993). SRC-LOGKOW for Windows. SRC, Syracuse, N.Y.
 - (18) CompuDrug L (1992). ProLogP. CompuDrug, Ltd, Budapeszt.
 - (19) ACD. ACD logP; Advanced Chemistry Development: Toronto, Ontario M5H 3V9, Kanada 2001.
 - (20) Lyman WJ (1990). Octanol/water partition coefficient. W: Lyman WJ, Reehl WF, Rosenblatt DH, eds, *Handbook of chemical property estimation*, American Chemical Society, Washington, D.C.
 - (21) Rekker RF, de Kort HM (1979). The hydrophobic fragmental constant: An extension to a 1 000 data point set. *Eur. J. Med. Chem. Chim. Ther.* 14: 479–488.
 - (22) Jübermann O (1958). Houben-Weyl (red.), *Methoden der Organischen Chemie*: 386–390.
-

Dodatek 1

Arkusz kalkulacyjny do obliczania minimalnych objętości wody wymaganych dla wykrywania substancji badanych o różnych wartościach LOG P_{ow} w fazie wodnej

Założenia:

- Maksymalna objętość poszczególnych podwielokrotnych części = 10 % objętości całkowitej; 5 podwielokrotnych części = 50 % objętości całkowitej.
- Stężenie substancji badanych = 0,7 × rozpuszczalność w obu fazach. W przypadku niższych stężeń wymagane są większe objętości.
- Objętość do wyznaczania LOD = 100 ml.
- Relacje log P_{ow} vs. log S_w oraz log P_{ow} vs. SR (S_{oct}/S_w) w uzasadnionym zakresie odzwierciedlają związki dla substancji badanych.

Oszacowanie S_w

| log P _{ow} | Równanie | log S _w | S _w (mg/l) |
|---------------------|---------------------------------------|--------------------|-----------------------|
| 4 | $(-0,922 \times \log P_{ow} + 4,184)$ | 0,496 | 3,133E+00 |
| 4,5 | $(-0,922 \times \log P_{ow} + 4,184)$ | 0,035 | 1,084E+00 |
| 5 | $(-0,922 \times \log P_{ow} + 4,184)$ | -0,426 | 3,750E-01 |
| 5,5 | $(-0,922 \times \log P_{ow} + 4,184)$ | -0,887 | 1,297E-01 |
| 6 | $(-0,922 \times \log P_{ow} + 4,184)$ | -1,348 | 4,487E-02 |
| 6,5 | $(-0,922 \times \log P_{ow} + 4,184)$ | -1,809 | 1,552E-02 |
| 7 | $(-0,922 \times \log P_{ow} + 4,184)$ | -2,270 | 5,370E-03 |
| 7,5 | $(-0,922 \times \log P_{ow} + 4,184)$ | -2,731 | 1,858E-03 |
| 8 | $(-0,922 \times \log P_{ow} + 4,184)$ | -3,192 | 6,427E-04 |

Oszacowanie S_{oct}

| log P _{ow} | Równanie | S _{oct} (mg/l) |
|---------------------|-------------------------------------|-------------------------|
| 4 | $\log P_{ow} = 0,88 \log SR + 0,41$ | 3,763E+04 |
| 4,5 | $\log P_{ow} = 0,88 \log SR + 0,42$ | 4,816E+04 |
| 5 | $\log P_{ow} = 0,88 \log SR + 0,43$ | 6,165E+04 |
| 5,5 | $\log P_{ow} = 0,88 \log SR + 0,44$ | 7,890E+04 |
| 6 | $\log P_{ow} = 0,88 \log SR + 0,45$ | 1,010E+05 |
| 6,5 | $\log P_{ow} = 0,88 \log SR + 0,46$ | 1,293E+05 |
| 7 | $\log P_{ow} = 0,88 \log SR + 0,47$ | 1,654E+05 |
| 7,5 | $\log P_{ow} = 0,88 \log SR + 0,48$ | 2,117E+05 |
| 8 | $\log P_{ow} = 0,88 \log SR + 0,49$ | 2,710E+05 |

| Masa całkowita substancji badanej (mg) | Masa _{oktanolu} /Masa _{wody} | Masa _{H2O} (mg) | Stęż _{H2O} (mg/l) | Masa _{oktanolu} (mg) | Stęż _{oktanolu} (mg/l) |
|--|--|--------------------------|----------------------------|-------------------------------|---------------------------------|
| 1 319 | 526 | 2,5017 | 2,6333 | 1 317 | 26 333 |

| Masa całkowita substancji badanej (mg) | Masa _{oktanolu} /Masa _{wody} | Masa _{H₂O} (mg) | Stęż _{H₂O} (mg/l) | Masa _{oktanolu} (mg) | Stęż _{oktanolu} (mg/l) |
|--|--|-------------------------------------|---------------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|
| 1 686 | 1 664 | 1,0127 | 1,0660 | 1 685 | 33 709 |
| 2 158 | 5 263 | 0,4099 | 0,4315 | 2 157 | 43 149 |
| 2 762 | 16 644 | 0,1659 | 0,1747 | 2 762 | 55 230 |
| 3 535 | 52 632 | 0,0672 | 0,0707 | 3 535 | 70 691 |
| 4 524 | 1664 36 | 0,0272 | 0,0286 | 4 524 | 90 480 |
| 5 790 | 5263 16 | 0,0110 | 0,0116 | 5 790 | 115 807 |
| 7 411 | 1 664 357 | 0,0045 | 0,0047 | 7 411 | 148 223 |
| 9 486 | 5 263 158 | 0,0018 | 0,0019 | 9 486 | 189 713 |

Obliczanie objętości

Minimalna objętość wymagana dla fazy H₂O przy każdym stężeniu LOD

| log K _{ow} | LOD (mikrogram/l)→ | 0,001 | 0,01 | 0,10 | 1,00 | 10 |
|----------------------------------|--------------------|-------|-------|-------|--------|---------|
| 4 | | 0,04 | 0,38 | 3,80 | 38 | 380 |
| 4,5 | | 0,09 | 0,94 | 9,38 | 94 | 938 |
| 5 | | 0,23 | 2,32 | 23,18 | 232 | 2 318 |
| 5,5 | | 0,57 | 5,73 | 57,26 | 573 | 5 726 |
| 6 | | 1,41 | 14,15 | 141 | 1 415 | 14 146 |
| 6,5 | | 3,50 | 34,95 | 350 | 3 495 | 34 950 |
| 7 | | 8,64 | 86,35 | 864 | 8 635 | 86 351 |
| 7,5 | | 21,33 | 213 | 2 133 | 21 335 | 213 346 |
| 8 | | 52,71 | 527 | 5 271 | 52 711 | 527 111 |
| Objętość zastosowana dla LOD (l) | 0,1 | | | | | |

Legenda do obliczeń

Stanowi < 10 % całkowitej objętości fazy wodnej, naczynie do ustalania równowagi o objętości 1 litra.

Stanowi < 10 % całkowitej objętości fazy wodnej, naczynie do ustalania równowagi o objętości 2 litrów.

Stanowi < 10 % całkowitej objętości fazy wodnej, naczynie do ustalania równowagi o objętości 5 litrów.

Stanowi < 10 % całkowitej objętości fazy wodnej, naczynie do ustalania równowagi o objętości 10 litrów.

Przekracza 10 % nawet dla 10-litrowego naczynia do ustalania równowagi.

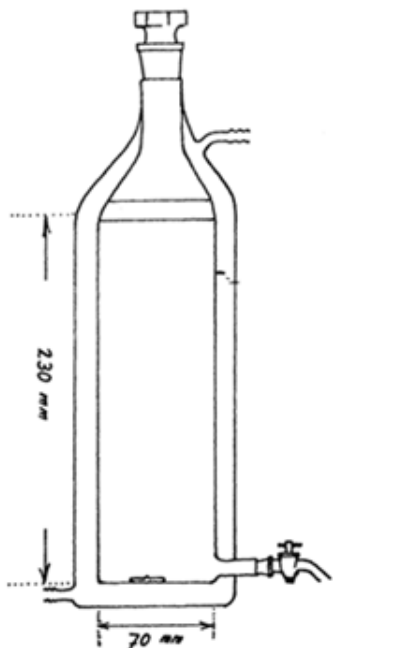
Przegląd wymaganych objętości jako funkcji rozpuszczalności w wodzie i log P_{ow}

Minimalna objętość wymagana dla fazy H₂O przy każdym stężeniu LOD (ml)

| log P _{ow} | S _w (mg/l) | LOD (mikrogram/l)→ | 0,001 | 0,01 | 0,10 | 1,00 | 10 |
|---------------------|-----------------------|--------------------|-------|------|-------|--------|----------|
| 4 | 10 | | 0,01 | 0,12 | 1,19 | 11,90 | 118,99 |
| | 5 | | 0,02 | 0,24 | 2,38 | 23,80 | 237,97 |
| | 3 | | 0,04 | 0,40 | 3,97 | 39,66 | 396,62 |
| | 1 | | 0,12 | 1,19 | 11,90 | 118,99 | 1 189,86 |

| log P _{ow} | S _w (mg/l) | LOD (mikrogram/l)→ | 0,001 | 0,01 | 0,10 | 1,00 | 10 |
|----------------------------------|-----------------------|--------------------|--------|----------|-----------|------------|--------------|
| 4,5 | 5 | | 0,02 | 0,20 | 2,03 | 20,34 | 203,37 |
| | 2 | | 0,05 | 0,51 | 5,08 | 50,84 | 508,42 |
| | 1 | | 0,10 | 1,02 | 10,17 | 101,68 | 1 016,83 |
| 5 | 0,5 | | 0,20 | 2,03 | 20,34 | 203,37 | 2 033,67 |
| | 1 | | 0,09 | 0,87 | 8,69 | 86,90 | 869,01 |
| | 0,5 | | 0,17 | 1,74 | 17,38 | 173,80 | 1 738,02 |
| | 0,375 | | 0,23 | 2,32 | 23,18 | 231,75 | 2 317,53 |
| 5,5 | 0,2 | | 0,43 | 4,35 | 43,45 | 434,51 | 4 345,05 |
| | 0,4 | | 0,19 | 1,86 | 18,57 | 185,68 | 1 856,79 |
| | 0,2 | | 0,37 | 3,71 | 37,14 | 371,36 | 3 713,59 |
| | 0,1 | | 0,74 | 7,43 | 74,27 | 742,72 | 7 427,17 |
| 6 | 0,05 | | 1,49 | 14,85 | 148,54 | 1 485,43 | 14 854,35 |
| | 0,1 | | 0,63 | 6,35 | 63,48 | 634,80 | 6 347,95 |
| | 0,05 | | 1,27 | 12,70 | 126,96 | 1 269,59 | 12 695,91 |
| | 0,025 | | 2,54 | 25,39 | 253,92 | 2 539,18 | 25 391,82 |
| 6,5 | 0,0125 | | 5,08 | 50,78 | 507,84 | 5 078,36 | 50 783,64 |
| | 0,025 | | 2,17 | 21,70 | 217,02 | 2 170,25 | 21 702,46 |
| | 0,0125 | | 4,34 | 43,40 | 434,05 | 4 340,49 | 43 404,93 |
| | 0,006 | | 9,04 | 90,43 | 904,27 | 9 042,69 | 90 426,93 |
| 7 | 0,003 | | 18,09 | 180,85 | 1 808,54 | 18 085,39 | 180 853,86 |
| | 0,006 | | 7,73 | 77,29 | 772,89 | 7 728,85 | 77 288,50 |
| | 0,003 | | 15,46 | 154,58 | 1 545,77 | 15 457,70 | 154 577,01 |
| | 0,0015 | | 23,19 | 231,87 | 2 318,66 | 23 186,55 | 231 865,51 |
| 7,5 | 0,001 | | 46,37 | 463,73 | 4 637,31 | 46 373,10 | 463 731,03 |
| | 0,002 | | 19,82 | 198,18 | 1 981,77 | 19 817,73 | 198 177,33 |
| | 0,001 | | 39,64 | 396,35 | 3 963,55 | 39 635,47 | 396 354,66 |
| | 0,0005 | | 79,27 | 792,71 | 7 927,09 | 79 270,93 | 792 709,32 |
| 8 | 0,00025 | | 158,54 | 1 585,42 | 15 854,19 | 158 541,86 | 1 585 418,63 |
| | 0,001 | | 33,88 | 338,77 | 3 387,68 | 33 876,77 | 338 767,72 |
| | 0,0005 | | 67,75 | 677,54 | 6 775,35 | 67 753,54 | 677 535,44 |
| | 0,00025 | | 135,51 | 1 355,07 | 13 550,71 | 135 507,09 | 1 355 070,89 |
| | 0,000125 | | 271,01 | 2 710,14 | 27 101,42 | 271 014,18 | 2 710 141,77 |
| Objętość zastosowana dla LOD (l) | | 0,1 | | | | | |

Dodatek 2

Przykład naczynia z płaszczem szklanym do wyznaczania P_{OW} metodą powolnego mieszania

3) rozdział B.2 otrzymuje brzmienie:

„B.2. OSTRA TOKSYCZNOŚĆ INHALACYJNA

WSTĘP

1. Niniejsza metoda badawcza jest równoważna metodzie opisanej w dotyczącej badań wytycznej OECD nr 403 (OECD TG 403) (2009) (1). Dotyczącą badań ostrej toksyczności inhalacyjnej wytyczną nr 403 (TG 403) przyjęto po raz pierwszy w 1981 r. Niniejsza zmieniona metoda badawcza B.2 (równoważna zmienionej wytycznej TG 403) została zaprojektowana jako bardziej elastyczna i mająca na celu zmniejszenie wykorzystania zwierząt oraz zaspokojenie potrzeb regulacyjnych. W ramach zmienionej metody badawczej przewidziano dwa rodzaje badań: tradycyjny protokół LC_{50} oraz protokół »stężenie \times czas« ($C \times t$). Podstawowe cechy niniejszej metody badawczej to możliwość uzyskania zależności stężenie-odpowiedź, od efektów nieletalnych po letalne, w celu wyprowadzenia mediany stężenia śmiertelnego (LC_{50}), stężenia progowego niepowodującego przypadków śmiertelnych (np. $LC01$) czy nachylenia krzywej, jak również w celu określenia potencjalnej podatności ze względu na płęć. Protokół $C \times t$ powinno się stosować wtedy, gdy istnieje szczególna, wynikająca z regulacji lub powodów naukowych potrzeba przeprowadzenia badań na zwierzętach z zastosowaniem wielu okresów trwania narażenia, np. do celów planowania działań w sytuacjach wyjątkowych [przykładowo do wyliczenia wartości dla wytycznych w sprawie poziomów narażenia ostrego (Acute Exposure Guideline Levels – AEGL), wytycznych w sprawie planowania działań w sytuacjach wyjątkowych (Emergency Response Planning Guidelines – ERPG) bądź poziomów progowych dla narażenia ostrego (Acute Exposure Threshold Levels – AETL)], czy też do celów zagospodarowania przestrzennego.
2. Wytyczne w sprawie przeprowadzania badań niniejszą metodą badawczą oraz interpretacji ich wyników można znaleźć w wytycznych dotyczących ostrej toksyczności inhalacyjnej (Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing) (GD 39) (2).
3. Definicje stosowane w kontekście niniejszej metody badawczej znajdują się na końcu tego rozdziału i w GD 39 (2).
4. Niniejsza metoda badawcza umożliwia scharakteryzowanie badanej substancji chemicznej oraz ilościową ocenę ryzyka, jak również pozwala na ocenę i klasyfikację badanych substancji chemicznych zgodnie z rozporządzeniem (WE) nr 1272/2008 (3). W dokumencie GD 39 (2) znajdują się wytyczne dotyczące wyboru odpowiedniej metody badawczej dla badania toksyczności ostrej. W przypadku gdy potrzebne są tylko informacje dotyczące klasyfikacji i oznakowania, zasadniczo zalecany jest rozdział B.52 niniejszego załącznika (4) [zob. GD 39 (2)]. Niniejsza metoda badawcza B.2 nie jest przeznaczona konkretnie do badania materiałów specjalnych, takich jak słabo rozpuszczalne materiały izometryczne lub włókniste czy też wytworzone nanomateriały.

ZAŁOŻENIA WSTĘPNE

5. Aby zminimalizować wykorzystanie zwierząt, przed rozważeniem wykonania badań według niniejszej metody badawczej laboratorium przeprowadzające badanie powinno wziąć pod uwagę wszystkie dostępne informacje na temat badanej substancji chemicznej, w tym wyniki istniejących badań (np. wykonanych metodą B.52 opisaną w niniejszym załączniku (4)), dzięki którym można byłoby uniknąć wykonywania dodatkowych badań. Informacje, które mogą być pomocne w doborze najbardziej odpowiedniego gatunku, szczepu, płci i sposobu narażenia oraz odpowiednich stężeń do badania obejmują nazwę, strukturę chemiczną i właściwości fizykochemiczne badanej substancji chemicznej; wyniki wszelkich badań toksyczności *in vitro* lub *in vivo*; spodziewane zastosowania i potencjalne narażenie ludzi; dostępne dane dotyczące (Q)SAR oraz dane toksykologiczne na temat strukturalnie powiązanych związków [zob. GD 39 (2)].
6. Należy w zakresie, w jakim jest to możliwe, unikać badania żrących lub drażniących substancji chemicznych w stężeniach, które mogą powodować silny ból lub stres. Potencjalne działanie żrące/drażniące należy ocenić na podstawie specjalistycznej wiedzy, wykorzystując dowody, takie jak doświadczenia z badań na ludziach i zwierzętach (np. z użyciem dawki powtarzanej w stężeniach, w których dana substancja nie jest żrąca/nie powoduje podrażnienia), istniejących danych *in vitro* (np. uzyskanych metodami z rozdziałów B.40 (5), B.40bis (6) niniejszego załącznika lub z wytycznej OECD TG 435 (7)), wartości pH, informacji dotyczących podobnych substancji lub wszelkich innych odnośnych danych, tak aby zbadać możliwość rezygnacji z dalszych badań. Dla zaspokojenia szczególnych potrzeb regulacyjnych (np. do celów planowania działań w sytuacjach wyjątkowych) można użyć niniejszej metody badawczej przy poddawaniu zwierząt działaniu tych materiałów, ponieważ daje to kierownikowi badania bądź głównemu badaczowi kontrolę nad wyborem stężeń docelowych. Stężenia te nie powinny jednak mieć działania podrażniającego/żrącego, ale powinny być wystarczające do przedłużenia krzywej stężenie-odpowiedź do poziomu, przy którym zostanie osiągnięty cel regulacyjny i naukowy danego badania. Stężenia należy dobierać indywidualnie w każdym przypadku, a wybór uzasadniać [zob. GD 39 (2)].

ZASADA BADANIA

7. Niniejsza zmieniona metoda badawcza B.2 została zaprojektowana w celu uzyskania wystarczających informacji na temat ostrej toksyczności badanej substancji chemicznej w celu umożliwienia jej klasyfikacji i otrzymania danych dotyczących śmiertelności (np. LC₅₀, LC₀₁ i nachylenia) dla jednej lub obu płci, potrzebnych do ilościowych ocen ryzyka. Niniejsza metoda badawcza obejmuje dwie metody. Pierwsza z nich to protokół tradycyjny, w którym grupy zwierząt narażane są na działanie stężenia granicznego (badanie graniczne) lub szeregu stężeń w procedurze sekwencyjnej przez określony z góry czas, zazwyczaj 4 godziny. Dla poszczególnych celów regulacyjnych mogą obowiązywać inne czasy trwania narażenia. Druga metoda to protokół (C x t), w ramach którego grupy zwierząt narażają się na działanie jednego stężenia (stężenia granicznego) lub szeregu różnych stężeń przez różny czas.
8. Zwierzęta w stanie agonalnym lub zwierzęta wykazujące oczywiste oznaki bólu czy oznaki ostrego i przewlekłego stresu powinny zostać uśmiercone w humanitarny sposób i uwzględnione w interpretacji wyników badań w ten sam sposób, co zwierzęta padłe w trakcie badania. Kryteria podejmowania decyzji co do uśmiercenia zwierząt w stanie agonalnym lub cierpiących silny ból oraz wytyczne dotyczące rozpoznawania prognozowanego lub nieuchronnie zbliżającego się zgonu są zawarte w dotyczących humanitarnego punktu końcowego wytycznych OECD nr 19 (8).

OPIS METODY

Wybór gatunku zwierząt

9. Zaleca się użycie zdrowych, młodych, dorosłych zwierząt pochodzących ze szczepów powszechnie wykorzystywanych w laboratorium. Preferowanym gatunkiem jest szczur, a w przypadku wykorzystania innego gatunku należy podać uzasadnienie.

Przygotowanie zwierząt

10. Samice powinny być nieródkami i nie mogą być w ciąży. W dniu narażenia zwierzęta powinny być młodymi dorosłymi osobnikami w wieku 8–12 tygodni, a ich masa ciała powinna mieścić się w zakresie $\pm 20\%$ średniej masy dla każdej płci zwierząt w tym samym wieku poddanych uprzednio narażeniu. Zwierzęta wybiera się losowo i oznacza w sposób umożliwiający identyfikację poszczególnych osobników. Zwierzęta przetrzymuje się w klatkach przez co najmniej pięć dni przed rozpoczęciem badania, aby umożliwić ich aklimatyzację do warunków laboratoryjnych. Zwierzęta powinny również być przyzwyczajane do przyrządów używanych w badaniu przez krótki okres przed badaniem, ponieważ zmniejszy to ich stres spowodowany wprowadzeniem do nowego środowiska.

Hodowla zwierząt

11. Temperatura w pomieszczeniach, w których przebywają zwierzęta doświadczalne, powinna wynosić $22 \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$. Najlepiej byłoby, gdyby wilgotność względna była utrzymywana w przedziale 30–70 %, chociaż może to być niemożliwe w przypadku stosowania wody jako nośnika. Przed narażeniem i po nim zwierzęta powinny zasadniczo być trzymane w klatkach w grupach podzielonych ze względu na płć i badane stężenie, ale liczba zwierząt w klatce nie powinna zakłócać możliwości obserwacji każdego zwierzęcia i powinna być taka, aby zminimalizować straty spowodowane kanibalizmem i walkami. Jeżeli zwierzęta mają być poddane narażeniu tylko przez nos, konieczne może być przyzwyczajanie ich do rur unieruchamiających. Rury unieruchamiające nie powinny powodować nadmiernego stresu fizycznego i termicznego dla zwierząt ani stresu spowodowanego unieruchomieniem. Unieruchomienie może mieć wpływ na fizjologiczne punkty końcowe, takie jak temperatura ciała (hipertermia) lub minutowa pojemność oddechowa. Jeżeli dostępne są dane ogólne, na podstawie których można wykazać, że takie zmiany nie występują w znaczącym stopniu, uprzednia adaptacja do rur unieruchamiających nie jest konieczna. Zwierzęta, których cała powierzchnia ciała jest narażana na działanie aerozolu,

w trakcie narażenia powinny być trzymane oddzielnie, aby zapobiec filtrowaniu badanego aerozolu przez futro innych zwierząt w tej samej klatce. Można stosować pasze konwencjonalne oraz certyfikowane pasze laboratoryjne, z wyjątkiem okresów poddawania narażeniu, należy także zapewnić nieograniczony dostęp do wody pitnej z instalacji wodociągowej. Oświetlenie powinno być sztuczne, w cyklu 12 godzin światła, 12 godzin ciemności.

Komory inhalacyjne

12. Przy wyborze komory inhalacyjnej należy wziąć pod uwagę charakter badanej substancji chemicznej i cel badania. Preferowaną drogą narażenia jest narażenie tylko przez nos (pojęcie to obejmuje narażenie tylko głowy, narażenie tylko przez nos lub narażenie tylko pyska). Narażenie tylko przez nos jest na ogół preferowane w badaniach aerozoli ciekłych lub stałych oraz par, które mogą skraplać się, tworząc aerozole. Narażenie całego ciała może bardziej sprzyjać osiągnięciu szczególnych celów badania, taki wybór należy jednak uzasadnić w sprawozdaniu z badania. Aby zagwarantować stabilność atmosfery przy zastosowaniu komory do poddawania narażeniu całego ciała, łączna objętość badanych zwierząt nie powinna przekraczać 5 % objętości komory. Zasady technik narażenia tylko przez nos oraz przez powierzchnię całego ciała oraz ich szczególne zalety i wady omówiono w GD 39 (2).

WARUNKI NARAŻENIA NA DZIAŁANIE SUBSTANCJI

Stosowanie stężeń

13. Narażenie tylko przez nos w przypadku szczurów może trwać do 6 godzin. Jeżeli narażeniu tylko przez nos poddaje się myszy, czas narażenia nie powinien zasadniczo przekraczać 4 godzin. Jeżeli potrzebne są badania z dłuższym czasem trwania narażenia, należy podać uzasadnienie [zob. GD 39 (2)]. Zwierzęta poddane działaniu aerozoli w komorach do poddawania narażeniu całego ciała należy przetrzymywać pojedynczo, aby zapobiec polykaniu badanej substancji chemicznej przy wylizywaniu innych zwierząt znajdujących się w tej samej klatce. W okresie narażenia na działanie substancji należy wstrzymać podawanie paszy. Podczas poddawania narażeniu całego ciała można zapewnić dostęp do wody.
14. Zwierzęta są poddawane narażeniu na działanie badanej substancji chemicznej w postaci gazu, pary, aerozolu lub mieszaniny tych postaci. Stan fizyczny, który ma być przedmiotem badania, zależy od właściwości fizykochemicznych badanej substancji chemicznej, wybranego stężenia lub formy fizycznej, która najprawdopodobniej będzie występować podczas postępowania z badaną substancją chemiczną i jej stosowania. Substancje chemiczne o charakterze higroskopijnym oraz chemicznie reaktywne należy badać w suchej atmosferze. Należy zachować ostrożność, aby uniknąć osiągnięcia stężenia wybuchowego.

Rozkład wielkości cząstek

15. W odniesieniu do wszystkich aerozoli oraz par, które mogą skraplać się, tworząc aerozole, należy dokonać klasyfikacji cząstek według wielkości. W celu umożliwienia narażenia wszystkich odpowiednich części dróg oddechowych na działanie danej substancji zaleca się aerozole o średnicy aerodynamicznej mediany rozkładu masowego (MMAD) wynoszącej od 1 do 4 μm przy geometrycznym standardowym odchyleniu (σ_g) równym od 1,5 do 3,0 (2) (9) (10). Należy dołożyć uzasadnionych starań, aby spełnić tę normę, jednak w razie niemożności jej osiągnięcia należy przedstawić ocenę eksperta. Przykładowo pary metali mogą zawierać cząstki mniejsze, niż przewidyuje to norma, a cząstki naładowane, włókna i materiały higroskopijne (których rozmiar zwiększa się w wilgotnym środowisku układu oddechowego) mogą tę normę przekraczać.

Przygotowanie badanej substancji chemicznej w nośniku

16. Do uzyskania odpowiedniego stężenia i rozmiaru cząstek badanej substancji chemicznej w atmosferze można zastosować nośnik. Zasadniczo preferowanym nośnikiem powinna być woda. Materiały stałe można poddać obróbce mechanicznej w celu uzyskania wymaganego rozkładu wielkości cząstek, jednak należy zachować ostrożność, aby badana substancja chemiczna nie uległa rozkładowi ani zmianom. W przypadkach, w których można przypuszczać, że w wyniku procesów mechanicznych zmienił się skład badanej substancji chemicznej (np. w ekstremalnych temperaturach powstających na skutek tarcia przy nadmiernym intensywnym mieleniu), należy go zweryfikować metodami analitycznymi. Należy dołożyć odpowiednich starań, aby uniknąć zanieczyszczenia badanej substancji chemicznej. Nie ma potrzeby badania materiałów granulowanych niemających charakteru sypkiego, które są celowo przygotowywane tak, aby nie ulegały wdychaniu. Należy wykonać próbę na ścieranie w celu wykazania, że przy postępowaniu z materiałem granulowanym nie powstają cząstki respirabilne. Jeżeli w wyniku próby na ścieranie powstaną substancje respirabilne, należy wykonać badanie toksyczności inhalacyjnej.

Zwierzęta kontrolne

17. Wykorzystanie równoległej ujemnej (poddanej działaniu powietrza) grupy kontrolnej nie jest konieczne. W przypadku wykorzystania nośnika innego niż woda w celu wytworzenia atmosfery na potrzeby badania należy użyć grupy kontrolnej nośnika tylko wtedy, gdy brak jest dostępnych danych historycznych na temat toksyczności inhalacyjnej. Jeżeli badanie toksyczności dla badanej substancji chemicznej zmieszanej z nośnikiem nie wykaże toksyczności, wynika z tego, że dany nośnik jest nietoksyczny w badanych stężeniach, a zatem nie ma potrzeby tworzenia grupy kontrolnej nośnika.

MONITOROWANIE WARUNKÓW NARAŻENIA NA DZIAŁANIE SUBSTANCJI

Przepływ powietrza w komorze

18. Przepływ powietrza przez komorę należy starannie kontrolować i monitorować w sposób ciągły, jak również rejestrować podczas narażenia na działanie substancji nie rzadziej niż co godzinę. Monitorowanie stężenia (lub stabilności) w atmosferze uzyskanej na potrzeby badania jest pomiarem całościowym wszystkich parametrów

dynamicznych i umożliwia w sposób pośredni kontrolę wszystkich istotnych parametrów dynamicznych w zakresie generowania atmosfery. Należy w szczególności uwzględnić kwestię zapobiegania ponownemu wdychaniu w komorach przeznaczonych do narażenia wyłącznie przez nos w przypadkach, gdy przepływ powietrza przez układ podawania substancji jest nieodpowiedni do zapewnienia dynamicznego przepływu powietrza zawierającego badaną substancję chemiczną. Istnieją zalecane metody, które można zastosować do wykazania, że w wybranych warunkach ponowne wdychanie nie zachodzi (2) (11). Stężenie tlenu powinno wynosić co najmniej 19 %, a stężenie dwutlenku węgla nie powinno przekraczać 1 %. Jeżeli istnieje uzasadnione przypuszczenie, że norm tych nie da się spełnić, należy zmierzyć stężenia tlenu i dwutlenku węgla.

Temperatura i wilgotność względna w komorze

19. W komorze należy utrzymywać temperaturę na poziomie 22 ± 3 °C. Wilgotność względną w strefie oddychania zwierząt – zarówno dla narażenia tylko przez nos, jak i dla narażenia całego ciała – należy monitorować i rejestrować co najmniej trzykrotnie podczas okresów poddawania działaniu substancji trwających do 4 godzin, a podczas okresów krótszych – co godzinę. Należy utrzymywać wilgotność względną w przedziale 30–70 %, choć może to być nieosiągalne (np. przy badaniu mieszanin na bazie wody) lub niemożliwe do zmierzenia w przypadku zakłócenia danej metody badawczej przez badaną substancję chemiczną.

Badana substancja chemiczna: stężenie nominalne

20. Tam, gdzie to możliwe, należy obliczyć i zarejestrować stężenie nominalne w komorze badawczej. Stężenie nominalne jest to masa wytworzonej badanej substancji chemicznej podzielona przez całkowitą objętość powietrza, które przeszło przez układ komory. Stężenie nominalne nie służy do charakterystyki narażenia zwierząt – porównanie stężenia nominalnego i rzeczywistego stanowi wskazówkę co do efektywności wytwarzania w układzie doświadczalnym, a zatem można je wykorzystać do wykrycia problemów związanych z wytwarzaniem.

Badana substancja chemiczna: stężenie rzeczywiste

21. Stężenie rzeczywiste jest to stężenie badanej substancji chemicznej w strefie oddychania zwierząt w komorze inhalacyjnej. Stężenia rzeczywiste można uzyskać metodami swoistymi (np. bezpośrednie pobieranie próbek, metody adsorpcyjne lub z wykorzystaniem reaktywności chemicznej, a następnie badanie metodami analitycznymi) lub nieswoistymi, takimi jak analiza grawimetryczna przy zastosowaniu filtra. Zastosowanie metody grawimetrycznej jest akceptowalne tylko w przypadku aerozoli proszkowych zawierających jeden składnik lub aerozoli cieczy o niskiej lotności i należy wtedy przed badaniem wykonać odpowiednią analizę, swoistą dla badanej substancji chemicznej. Za pomocą metody grawimetrycznej można również określić stężenie wieloskładnikowego aerozolu proszkowego. Do tego są jednak konieczne dane analityczne, za pomocą których można wykazać, że skład materiału znajdującego się w powietrzu jest podobny do składu materiału wyjściowego. W razie braku takich informacji może być konieczna ponowna analiza badanej substancji chemicznej (najlepiej znajdującej się w powietrzu) w toku badania, w regularnych odstępach czasowych. W przypadku środków w formie aerozoli, które mogą ulec odparowaniu lub sublimacji, należy wykazać, że przy zastosowaniu wybranej metody zebrano wszystkie fazy. W sprawozdaniu z badania należy podać stężenia docelowe, nominalne i rzeczywiste, ale w analizach statystycznych do wyliczenia wartości stężeń śmiertelnych uwzględni się tylko stężenia rzeczywiste.
22. Jeżeli to możliwe, należy używać badanej substancji chemicznej pochodzącej z jednej partii, a badaną próbkę należy przechowywać w warunkach zapewniających jej czystość, jednorodność i stabilność. Przed rozpoczęciem badania należy scharakteryzować badaną substancję chemiczną, w tym jej czystość, oraz, o ile jest to wykonalne z technicznego punktu widzenia, określić tożsamość oraz ilości zidentyfikowanych domieszek i zanieczyszczeń. Można to wykazać, między innymi, za pomocą następujących danych: czasu retencji i względnej powierzchni sygnału, masy cząsteczkowej uzyskanej w drodze spektrometrii masowej lub chromatografii gazowej bądź innych oszacowań. Mimo że identyfikacja badanej próbki nie należy do obowiązków laboratorium badawczego, rozsądne może być potwierdzenie przez to laboratorium charakterystyki, którą przedstawił sponsor, przynajmniej w ograniczonym zakresie (np. koloru, cech fizycznych itp.).
23. Podczas badania należy utrzymywać możliwie niezmienną atmosferę i monitorować ją stale lub co pewien czas, w zależności od metody analitycznej. Jeżeli stosuje się pobieranie próbek co pewien czas, podczas czterogodzinnego badania należy pobierać próbki powietrza w komorze nie rzadziej niż dwa razy podczas badania. Jeżeli z powodu ograniczonej prędkości przepływu powietrza lub niskich stężeń jest to niemożliwe, można pobrać jedną próbkę na cały okres narażenia. W razie wystąpienia znacznych fluktuacji pomiędzy próbkami dla kolejnych badanych stężeń należy pobrać cztery próbki na okres narażenia. Wartości stężeń w komorze dla poszczególnych próbek nie powinny odbiegać od stężenia średniego o więcej niż ± 10 % dla gazów i par oraz o więcej niż ± 20 % dla aerozoli ciekłych lub stałych. Należy obliczyć i zapisać okres wyrównania stężeń w komorze (t_{95}). Czas trwania narażenia obejmuje czas wprowadzania badanej substancji chemicznej do komory przy uwzględnieniu czasu potrzebnego do osiągnięcia t_{95} . Wytyczne dotyczące szacowania t_{95} można znaleźć w GD 39 (2).
24. W przypadku bardzo złożonych mieszanin składających się z gazów/par i aerozoli (np. w przypadku atmosfery spalania i badanych substancji chemicznych wydzielanych ze specjalnych produktów/urządzeń do zastosowania końcowego) każda faza może zachowywać się inaczej w komorze inhalacyjnej, należy zatem wybrać co najmniej jedną substancję wskaźnikową (analit) z każdej fazy (gaz/para i aerozol) – zazwyczaj jest to główna substancja czynna mieszaniny. Jeżeli badana substancja chemiczna jest mieszaniną, należy podać stężenie analityczne w odniesieniu do całej mieszaniny, a nie tylko substancji czynnej lub składnika aktywnego (analitu). Dodatkowe informacje na temat stężeń rzeczywistych można znaleźć w GD 39 (2).

Badana substancja chemiczna: Rozkład wielkości cząstek

25. Rozkład wielkości cząstek aerozoli należy określać co najmniej dwa razy podczas każdego czterogodzinnego okresu narażenia za pomocą impaktora kaskadowego lub innego instrumentu, takiego jak aerodynamiczny spektrometr pomiaru cząstek. Jeżeli można wykazać równoważność wyników uzyskanych za pośrednictwem impaktora kaskadowego lub innego instrumentu, ten inny instrument może być stosowany przez cały okres badania. W celu potwierdzenia sprawności zatrzymywania cząstek przez instrument główny należy równoległe do tego instrumentu stosować drugie urządzenie, takie jak filtr grawimetryczny lub odpylacz/bełkotkę. Stężenie masowe uzyskane na podstawie analizy wielkości cząstek powinno mieścić się w rozsądnych granicach stężenia masowego uzyskanego poprzez analizę filtrów [zob. GD 39 (2)]. Jeśli można wykazać równoważność w początkowej fazie badania, dalsze pomiary potwierdzające można pominąć. Ze względu na dobrostan zwierząt należy podjąć środki mające na celu zminimalizowanie ilości danych niejednoznacznych, które mogą prowadzić do konieczności powtórzenia narażenia. Klasyfikację cząstek według wielkości należy przeprowadzić w odniesieniu do par, jeżeli istnieje jakkolwiek możliwość tworzenia się aerozolu wskutek kondensacji par lub jeśli cząstki są wykrywane w atmosferze parowej mającej potencjał tworzenia faz mieszanych (zob. pkt 15).

PROCEDURA

26. Poniżej opisano dwa rodzaje badań: protokół tradycyjny oraz protokół $C \times t$. Oba protokoły mogą obejmować badanie rozpoznawcze, badanie główne lub badanie graniczne (protokół tradycyjny) albo badanie przy stężeniu granicznym ($C \times t$). Jeżeli wiadomo, że podatność zależy od płci, kierownik badania może zdecydować o przeprowadzeniu badań przy użyciu tylko osobników tej płci, która jest bardziej podatna. Jeśli gatunki gryzoni inne niż szczury poddaje się narażeniu tylko przez nos, maksymalne okresy narażenia można dostosować, by zminimalizować charakterystyczny dla danego gatunku stres. Przed rozpoczęciem badania należy uwzględnić wszelkie dostępne dane w celu zminimalizowania wykorzystania zwierząt. Przykładowo dzięki danym powstałym przy użyciu metody B.52 opisanej w niniejszym załączniku (4) można wyeliminować potrzebę przeprowadzenia badania rozpoznawczego oraz wykazać większą podatność którejs z płci [zob. GD 39 (2)].

PROTOKÓŁ TRADYCYJNY**Zasady ogólne: protokół tradycyjny**

27. W badaniu zgodnie z protokołem tradycyjnym grupy zwierząt poddawane są działaniu badanej substancji chemicznej przez określony czas (zazwyczaj 4 godziny) tylko przez nos lub w komorze do poddawania narażeniu całego ciała. Zwierzęta poddawane są działaniu stężenia granicznego (badanie graniczne) lub działaniu co najmniej trzech stężeń w procedurze sekwencyjnej (badanie główne). Przed badaniem głównym można przeprowadzić badanie rozpoznawcze, chyba że istnieją już pewne informacje dotyczące badanej substancji chemicznej, takie jak uprzednio przeprowadzone badanie metodą B.52 [zob. GD 39 (2)].

Badanie rozpoznawcze: protokół tradycyjny

28. Badanie rozpoznawcze służy do oszacowania siły działania badanej substancji chemicznej, identyfikacji związków z płcią różnic w podatności oraz pomocniczo w doborze poziomów stężenia podczas narażenia dla badania głównego lub badania granicznego. Przy wyborze poziomów stężenia na potrzeby badania rozpoznawczego należy wykorzystać wszystkie dostępne informacje, w tym dostępne dane dotyczące (Q)SAR i podobnych chemikaliów. Na działanie każdego stężenia należy narażać nie więcej niż trzech samców i trzy samice (trzy zwierzęta każdej płci mogą być potrzebne do ustalenia zróżnicowania podatności pomiędzy płciami). Badanie rozpoznawcze może obejmować jedno stężenie, ale w razie potrzeby można zbadać więcej stężeń. Badanie rozpoznawcze nie powinno przypominać badania głównego pod względem liczby badanych zwierząt i użytych stężeń. W miejsce badania rozpoznawczego można wykorzystać uprzednio przeprowadzone badanie metodą B.52 (4) [zob. GD 39 (2)].

Badanie graniczne: protokół tradycyjny

29. Badanie graniczne stosuje się wtedy, gdy badana substancja chemiczna jest znana lub można się spodziewać, że jest ona praktycznie nietoksyczna, tzn. powoduje efekt toksyczny dopiero powyżej stężenia granicznego przewidzianego przepisami. W badaniu granicznym pojedynczą grupę składającą się z trzech samców i trzech samic poddaje się działaniu badanej substancji chemicznej w stężeniu granicznym. Informacje na temat toksyczności badanej substancji chemicznej można uzyskać na podstawie wiedzy na temat podobnych zbadanych chemikaliów, z uwzględnieniem tożsamości i zawartości procentowej składników, o których wiadomo, że mają znaczenie z punktu widzenia toksyczności. W sytuacji niewystarczającej ilości lub braku informacji na temat toksyczności badanej substancji chemicznej lub w przypadku, gdy substancja ta zgodnie z oczekiwaniami może być toksyczna, należy przeprowadzić badanie główne.
30. Dobór stężeń granicznych zazwyczaj zależy od wymogów regulacyjnych. Jeśli stosowane jest rozporządzenie (WE) nr 1272/2008, stężenia graniczne dla gazów, par i aerozoli wynoszą odpowiednio 20 000 ppm, 20 mg/l i 5 mg/l (lub maksymalne stężenie możliwe do uzyskania) (3). W przypadku niektórych badanych substancji chemicznych wytworzenie stężeń granicznych może być trudne technicznie, w szczególności dla substancji występujących w postaci par i aerozoli. Przy badaniu aerozoli celem podstawowym powinno być osiągnięcie takiego rozmiaru cząstek, aby mogły one ulec wdychaniu (MMAD od 1 do 4 μm). Dla większości badanych substancji chemicznych jest to możliwe przy stężeniu 2 mg/l. Próby badania aerozoli przy stężeniu większym niż 2 mg/l należy przeprowadzać tylko w przypadku, gdy możliwe jest uzyskanie cząstek o rozmiarze takim, aby mogły ulec wdychaniu [zob. GD 39 (2)]. W rozporządzeniu (WE) nr 1272/2008 nie zaleca się badań z użyciem stężeń większych od stężenia granicznego ze względu na dobrostan zwierząt (3). Stężenie graniczne należy brać pod uwagę tylko w przypadku znacznego prawdopodobieństwa, że wyniki takich badań przyniosą bezpośrednie korzyści dla ochrony zdrowia ludzi (3), a w sprawozdaniu z badania należy podać uzasadnienie. W przypadku badanych substancji chemicznych, które są potencjalnie wybuchowe, należy dołożyć starań w celu uniknięcia warunków sprzyjających wybuchowi. Aby uniknąć zbędnego wykorzystywania zwierząt, należy przed badaniem granicznym przeprowadzić test próbny bez udziału zwierząt w celu upewnienia się, że warunki w komorze do przeprowadzenia badania granicznego są możliwe do osiągnięcia.

31. Jeżeli przy stężeniu granicznym obserwowana jest śmiertelność lub stany agonalne, wyniki badania granicznego mogą pełnić rolę badania rozpoznawczego dla dalszych badań przy innych stężeniach (zob. badanie główne). Jeżeli właściwości fizyczne lub chemiczne badanej substancji chemicznej uniemożliwiają osiągnięcie stężenia granicznego, należy przeprowadzić badanie przy maksymalnym osiągalnym stężeniu. Jeżeli przy maksymalnym osiągalnym stężeniu występuje śmiertelność mniejsza niż 50 %, dalsze badania nie są konieczne. Jeżeli uzyskanie stężenia granicznego było niemożliwe, w sprawozdaniu z badania należy to wyjaśnić i na dowód podać odpowiednie dane. Jeżeli maksymalne możliwe do uzyskania stężenie pary nie wywołuje toksyczności, może być konieczne podanie badanej substancji chemicznej jako aerozolu ciekłego.

Badanie główne: protokół tradycyjny

32. Badanie główne wykonuje się zazwyczaj przy wykorzystaniu pięciu samców i pięciu samic (lub 5 zwierząt płci podatnej na działanie substancji, jeśli jest znana) na każdy poziom stężenia i dla co najmniej trzech stężeń. Należy użyć poziomów stężeń wystarczających do wykonania rzetelnej analizy statystycznej. Odstępy czasowe między podawaniem dawek w każdej grupie poddawanej narażeniu określa się na podstawie czasu wystąpienia, długości trwania i ostrości oznak toksyczności. Należy odwlec narażenie zwierząt na działanie kolejnego stężenia do momentu, gdy można w sposób uzasadniony uznać, że uprzednio badane zwierzęta przeżyły. Dzięki temu kierownik badania może dopasować stężenie docelowe dla kolejnej grupy poddawanej narażeniu. Jednak z powodu zależności od zaawansowanych technologii rozwiązanie takie nie zawsze daje się w praktyce zastosować podczas badań toksyczności inhalacyjnej, zatem o narażeniu zwierząt na działanie substancji przy kolejnym poziomie stężenia należy zdecydować na podstawie uprzednich doświadczeń i osądu naukowego. W przypadku badania mieszanin należy wziąć pod uwagę GD 39 (2).

PROTOKÓŁ »STĘŻENIE × CZAS« (C × t)

Zasady ogólne: protokół C × t

33. Alternatywą dla protokołu tradycyjnego przy ocenie toksyczności inhalacyjnej może być wykonywane w procedurze sekwencyjnej badanie C × t (12) (13) (14). Metoda ta umożliwia narażanie zwierząt na działanie badanej substancji chemicznej przy wielu poziomach stężeń i przez wiele okresów trwania. Wszystkie badania przeprowadza się w komorze do poddawania narażeniu tylko przez nos (w tym protokole zastosowanie komór do poddawania narażeniu całego ciała byłoby niepraktyczne). Protokół zilustrowany jest diagramem w dodatku 1. Zgodnie z wynikami analizy symulacyjnej zarówno protokół tradycyjny, jak i protokół C × t mogą dawać odporne wartości LC₅₀, ale w wyniku zastosowania protokołu C × t uzyskuje się lepsze wartości LC₀₁ i LC₁₀ (15).
34. W analizie symulacyjnej wykazano, że przy badaniu 4 stężeń i 5 okresów narażenia w badaniu głównym zasadniczo odpowiednie może być wykorzystanie dwóch osobników na interwał C × t (jeden z każdej płci, jeśli wykorzystywane są samce i samice, lub dwa osobniki płci bardziej podatnej). W pewnych okolicznościach kierownik badania może zdecydować o wykorzystaniu dwóch szczurów każdej płci na interwał C × t (15). Dzięki wykorzystaniu dwóch osobników każdej płci na każdy punkt oznaczający dane stężenie przy danym czasie można zmniejszyć błędy systematyczne i zmienność szacunków, zwiększyć dokładność szacunków i poprawić przedział ufności. Jednak w przypadku, gdy rozrzut danych jest zbyt duży, aby wyprowadzić oszacowanie (przy wykorzystaniu jednego osobnika danej płci lub dwóch osobników płci bardziej podatnej) może wystarczyć również zastosowanie narażenia na działanie substancji przy piątej wartości stężenia. Dalsze wytyczne co do liczby zwierząt i stężeń, jakie mają być wykorzystane w badaniu C × t, znajdują się w GD 39 (2).

Badanie rozpoznawcze: protokół C × t

35. Badanie rozpoznawcze służy do oszacowania siły działania badanej substancji chemicznej oraz pomocniczo w doborze poziomów stężenia podczas narażenia dla badania głównego. Aby dobrać odpowiednie stężenie początkowe do badania głównego i zminimalizować liczbę wykorzystanych zwierząt, może być potrzebne badanie rozpoznawcze przy wykorzystaniu do trzech zwierząt na płęć i stężenie [szczegóły można znaleźć w dodatku III do GD 39 (2)]. Do ustalenia różnicy związanej z płcią może być konieczne wykorzystanie trzech osobników każdej płci. Zwierzęta te należy poddać narażeniu przez jeden okres, zazwyczaj 240 min. Należy ocenić możliwość wytworzenia odpowiednich atmosfer doświadczalnych podczas wstępnych badań technicznych przeprowadzanych bez udziału zwierząt. Zazwyczaj nie ma potrzeby przeprowadzania badania rozpoznawczego, jeśli dostępne są dane dotyczące śmiertelności z badań przeprowadzonych metodą B.52 (4). Przy doborze początkowych stężeń docelowych w badaniu metodą B.2 kierownik badania powinien uwzględnić wzorce śmiertelności zaobserwowane we wszelkich dostępnych badaniach przeprowadzonych metodą B.52 (4) dla obu płci i wszystkich przebadanych stężeń [zob. GD 39 (2)].

Stężenie początkowe: protokół C × t

36. Stężenie początkowe (sesja narażenia I) (dodatek 1) to stężenie graniczne albo stężenie dobrane przez kierownika badania na podstawie badania rozpoznawczego. Na działanie tego stężenia wystawiane są grupy po jednym osobniku każdej płci przez wiele okresów trwania (np. po 15, 30, 60, 120 lub 240 minut), łącznie 10 zwierząt (tak zwana sesja narażenia I) (dodatek 1).
37. Dobór stężeń granicznych zazwyczaj zależy od wymogów regulacyjnych. Jeśli stosowane jest rozporządzenie (WE) nr 1272/2008, stężenia graniczne dla gazów, par i aerozoli wynoszą odpowiednio 20 000 ppm, 20 mg/l i 5 mg/l (lub maksymalne stężenie możliwe do uzyskania) (3). W przypadku niektórych badanych substancji chemicznych wytworzenie stężeń granicznych może być trudne technicznie, w szczególności dla substancji występujących w postaci par i aerozoli. Przy badaniu aerozoli celem powinno być uzyskanie cząstek o rozmiarze takim, aby mogły ulec wdychaniu (tzn. o MMAD od 1 do 4 µm) przy stężeniu granicznym równym 2 mg/l. Jest to możliwe dla większości badanych substancji chemicznych. Próby badania aerozoli przy stężeniu większym niż 2 mg/l należy przeprowadzać tylko w przypadku, gdy możliwe jest uzyskanie cząstek o rozmiarze takim, aby mogły ulec wdychaniu [zob. GD 39 (2)]. W rozporządzeniu (WE) nr 1272/2008 nie zaleca się badań z użyciem stężeń większych od stężenia granicznego ze względu na dobrostan zwierząt (3). Badanie stężeń większych od stężenia granicznego należy brać pod uwagę tylko w przypadku znacznego prawdopodobieństwa, że wyniki

takich badań przyniosą bezpośrednie korzyści dla ochrony zdrowia ludzi (3), a w sprawozdaniu z badania należy podać uzasadnienie. W przypadku badanych substancji chemicznych, które są potencjalnie wybuchowe, należy dołożyć starań w celu uniknięcia warunków sprzyjających wybuchowi. Aby uniknąć zbędnego wykorzystywania zwierząt, należy przed badaniem z użyciem stężenia początkowego przeprowadzić test próbny bez udziału zwierząt w celu upewnienia się, że warunki w komorze do przeprowadzenia badania przy tym stężeniu są możliwe do osiągnięcia.

38. Jeżeli przy stężeniu początkowym obserwowana jest śmiertelność lub stany agonalne, wyniki badań przy tym stężeniu mogą pełnić rolę punktu początkowego dla dalszych badań przy innych stężeniach (zob. badanie główne). Jeżeli właściwości fizyczne lub chemiczne badanej substancji chemicznej uniemożliwiają osiągnięcie stężenia granicznego, należy przeprowadzić badanie przy maksymalnym osiągalnym stężeniu. Jeżeli przy maksymalnym osiągalnym stężeniu występuje śmiertelność mniejsza niż 50 %, dalsze badania nie są konieczne. Jeżeli uzyskanie stężenia granicznego było niemożliwe, w sprawozdaniu z badania należy to wyjaśnić i na dowód podać odpowiednie dane. Jeżeli maksymalne możliwe do uzyskania stężenie pary nie wywołuje toksyczności, może być konieczne podanie badanej substancji chemicznej jako aerozolu ciekłego.

Badanie główne: protokół C × t

39. Stężenie początkowe (sesja narażenia I) (dodatek 1) w badaniu głównym to stężenie graniczne albo stężenie dobrane przez kierownika badania na podstawie badania rozpoznawczego. Jeżeli podczas sesji narażenia I lub po niej wystąpi śmiertelność, stężenia i okresy narażenia dla sesji narażenia II należy dobrać na podstawie minimalnego narażenia (C × t), które prowadzi do zgonu. Każda kolejna sesja narażenia zależy od sesji poprzedniej (zob. dodatek 1).
40. Dla wielu badanych substancji chemicznych wyniki otrzymane przy stężeniu początkowym wraz z trzema dodatkowymi sesjami narażenia charakteryzującymi się drobniejszą siatką czasową (daną szeregiem geometrycznym okresów narażenia określonym współczynnikiem pomiędzy kolejnymi okresami, zazwyczaj $\sqrt{2}$) będą wystarczające do ustalenia zależności śmiertelności C × t (15), ale zastosowanie narażenia przy piątej wartości stężenia może również przynieść pewne korzyści [zob. dodatek 1 oraz GD 39 (2)]. Sposób matematycznego opracowania wyników zastosowania protokołu C × t podano w dodatku 1.

OBSERWACJE

41. Zwierzęta w trakcie okresu narażenia należy często poddawać obserwacji klinicznej. Po narażeniu należy prowadzić obserwacje kliniczne – w dniu narażenia co najmniej dwukrotnie, lub częściej, jeśli wskazuje na to reakcja zwierząt na poddawanie działaniu substancji, a po tym dniu co najmniej raz dziennie przez łącznie 14 dni. Długość okresu obserwacji nie jest określona, należy ją jednak ustalić na podstawie charakteru i czasu wystąpienia objawów klinicznych oraz długości okresu zdrowienia. Czas, w jakim pojawiają się i zanikają oznaki toksyczności, jest istotny, szczególnie w przypadku tendencji do występowania opóźnionych oznak toksyczności. Wszystkie obserwacje są systematycznie zapisywane w ewidencji prowadzonej osobno dla każdego zwierzęcia. Zwierzęta, u których stwierdzono stan agonalny, oraz zwierzęta wykazujące objawy silnego bólu lub stresu należy ze względu na ich dobrostan uśmiercić w sposób humanitarny. Przy badaniu pod kątem klinicznych oznak toksyczności należy zachować ostrożność, aby nie pomylić początkowego złego wyglądu i przejściowych zmian oddechowych, będących skutkiem procedury narażenia, z toksycznością związaną z badaną substancją chemiczną, która wymagałaby wcześniejszego uśmiercenia zwierząt. Należy przestrzegać zasad i kryteriów streszczonych w wytycznych dotyczących humanitarnego punktu końcowego (GD 19) (7). W przypadku uśmiercenia zwierząt z przyczyn humanitarnych lub stwierdzenia ich zgonu należy możliwie najdokładniej zapisać czas zgonu.
42. Obserwacje zwierząt w klatkach powinny obejmować zmiany skóry i sierści, oczu i błon śluzowych; jak również zmiany w układzie oddechowym i układzie krążenia, zmiany w autonomicznym i ośrodkowym układzie nerwowym oraz zmiany w aktywności somatycznej i sposobie zachowania. O ile to możliwe, należy odnotować rozróżnienie pomiędzy skutkami miejscowymi i ogólnoustrojowymi. Szczególną uwagę należy poświęcić obserwacjom drżenia, konwulsji, ślinotoku, biegunki, letargu, snu i śpiączki. Pomiar temperatury w odbycie może dostarczyć dodatkowych dowodów potwierdzających odruchowe spowolnienie oddechu lub hipo-/hipertermię w związku z poddawaniem działaniu substancji lub przetrzymywaniem w zamknięciu.

Masa ciała

43. Należy odnotowywać masę ciała poszczególnych zwierząt: raz podczas okresu aklimatyzacji, w dniu narażenia przed narażeniem (dzień 0), oraz przynajmniej w dniach 1, 3 i 7 (a następnie co tydzień), jak również w momencie zgonu lub eutanazji, jeśli śmierć nastąpi później niż w dniu 1. Masę ciała uznaje się za krytyczny wskaźnik toksyczności, zatem zwierzęta wykazujące stały spadek wagi na poziomie $\geq 20\%$ w porównaniu z wartościami przed badaniem należy ściśle monitorować. Po zakończeniu okresu po narażeniu zwierzęta, które przeżyły, są ważone i humanitarnie uśmiercane.

Patologia

44. Wszystkie badane zwierzęta, włączając te, które padły podczas badań lub zostały poddane eutanazji i wyeliminowane z badań ze względu na ich dobrostan, należy poddać pełnemu rozpoznaniu histopatologicznemu. Jeżeli sekcji zwłok nie można przeprowadzić natychmiast po znalezieniu martwego zwierzęcia, zwierzę należy schłodzić (nie zamrozić) do temperatury wystarczająco niskiej do zminimalizowania autolizy. Sekcję zwłok należy przeprowadzić możliwie szybko, zwykle w ciągu jednego lub dwóch dni. W odniesieniu do każdego zwierzęcia należy odnotować wszystkie makroskopowe zmiany patologiczne ze szczególnym uwzględnieniem wszelkich zmian w drogach oddechowych.

45. Można rozważyć przeprowadzenie dodatkowych, uprzednio zaprojektowanych testów w celu zwiększenia wartości interpretacyjnej badania, np. pomiaru masy płuc u szczurów, które przeżyły, czy dostarczenia dowodów na podrażnienie poprzez badanie dróg oddechowych pod mikroskopem. Można również objąć badaniem organy wykazujące wyraźne zmiany patologiczne u zwierząt, które przeżyły 24 lub więcej godzin, oraz organy, co do których wiadomo lub można oczekiwać, że narażenie miało na nie wpływ. Z badania mikroskopowego całego układu oddechowego można uzyskać użyteczne informacje na temat badanych substancji chemicznych, które reagują z wodą, takich jak kwasy i badane substancje chemiczne o właściwościach higroskopijnych.

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Dane

46. Należy podać dane dotyczące masy ciała i wyników sekcji zwłok dotyczące poszczególnych zwierząt. Dane z obserwacji klinicznych należy zestawić w postaci tabeli, przedstawiając w odniesieniu do każdej badanej grupy liczbę wykorzystanych zwierząt, liczbę zwierząt wykazujących specyficzne oznaki toksyczności, liczbę zwierząt padłych w trakcie trwania badania lub uśmierconych z przyczyn humanitarnych, czas zgonu poszczególnych zwierząt, opis skutków toksycznych oraz ich przebieg w czasie i odwracalność, a także wyniki sekcji zwłok.

Sprawozdanie z badania

47. Sprawozdanie z badania powinno w stosownych przypadkach zawierać następujące informacje:

Badane zwierzęta i ich hodowla

- opis warunków przetrzymywania w klatkach, w tym: liczba (lub zmiana liczby) zwierząt na klatkę, ściółka, temperatura otoczenia i wilgotność względna, fotoperiod i określenie diety,
- wykorzystany gatunek/szczep oraz uzasadnienie zastosowania gatunków innych niż szczur,
- liczba, wiek i płeć zwierząt,
- metoda randomizacji,
- szczegółowe informacje na temat jakości pożywienia i wody (włączając w to rodzaj/źródło diety oraz źródło wody),
- opis wszelkich przygotowań przed badaniem, w tym diety, kwarantanny i leczenia chorób,

Badana substancja chemiczna

- cechy fizyczne, czystość oraz w stosownych przypadkach właściwości fizykochemiczne (w tym izomeryzacja),
- dane identyfikacyjne i numer w rejestrze Chemical Abstract Services (CAS), jeżeli jest znany,

Nośnik

- uzasadnienie zastosowania nośnika oraz uzasadnienie wyboru nośnika (jeżeli jest inny niż woda),
- dane historyczne lub uzyskane równoległe wykazujące, że nośnik nie zakłóca wyniku badania,

Komora inhalacyjna

- szczegółowy opis komory inhalacyjnej, w tym jej rozmiary i objętość,
- źródło i opis wyposażenia wykorzystywanego do celów narażenia zwierząt, jak również do wytwarzania atmosfery,
- wyposażenie do pomiaru temperatury, wilgotności, rozmiaru cząstek i stężenia rzeczywistego,

- źródło powietrza, metoda oczyszczania dostarczanego/pobieranego powietrza oraz system klimatyzacji,
- metody kalibracji wyposażenia w celu zapewnienia jednorodnej atmosfery na potrzeby badania,
- różnica ciśnienia (dodatnia lub ujemna),
- porty narażenia w komorze (narażenie tylko przez nos); lokalizacja zwierząt w układzie (narażenie całego ciała),
- jednorodność/stabilność w czasie atmosfery na potrzeby badania,
- lokalizacja czujników temperatury i wilgotności oraz pobieranie próbek powietrza w komorze,
- natężenie przepływu powietrza, natężenie przepływu powietrza/port narażenia (narażenie tylko przez nos) lub ładunek zwierząt/komorę (narażenie całego ciała),
- informacje na temat wyposażenia stosowanego do pomiaru zawartości tlenu i dwutlenku węgla, w stosownych przypadkach,
- czas potrzebny na wyrównanie stężeń w komorze inhalacyjnej (t_{95}),
- liczba zmian objętości na godzinę,
- urządzenia pomiarowe (w stosownych przypadkach),

Dane dotyczące narażenia

- uzasadnienie wyboru docelowego stężenia w badaniu głównym,
- stężenia nominalne (całkowita masa badanej substancji chemicznej wprowadzonej do komory inhalacyjnej podzielona przez objętość powietrza przepuszczonego przez komorę),
- rzeczywiste stężenia badanej substancji chemicznej w próbkach ze strefy oddychania zwierząt; w przypadku mieszanin, które tworzą heterogeniczne formy fizyczne (gazy, pary, aerozole), każdą substancję można analizować oddzielnie,
- wszystkie stężenia substancji w powietrzu należy podawać w jednostkach masy (np. mg/l, mg/m^3 itd.); w nawiasie można podać również jednostki objętości (np. ppm, ppb itd.),
- rozkład wielkości cząstek, średnica aerodynamiczna mediany rozkładu masowego (MMAD) oraz geometryczne odchylenie standardowe (σ_g), w tym metody ich obliczania. Należy odnotować poszczególne analizy wielkości cząstek,

Warunki badania

- szczegółowe informacje na temat przygotowania badanej substancji chemicznej, w tym szczegóły dotyczące wszelkich procedur zastosowanych w celu zmniejszenia rozmiaru cząstek ciał stałych lub przygotowania roztworów badanej substancji chemicznej. W przypadkach, gdy procesy mechaniczne mogły wpłynąć na zmianę składu badanej substancji chemicznej, należy zamieścić wyniki analiz mających na celu weryfikację składu badanej substancji chemicznej,
- opis (najlepiej wraz ze schematem) wyposażenia wykorzystywanego do wytworzenia atmosfery na potrzeby badania i narażania zwierząt na jej działanie,
- szczegółowe informacje na temat zastosowanej metody analizy chemicznej oraz walidacji metody (w tym wydajność odzysku badanej substancji chemicznej ze środka do pobierania próbek),
- uzasadnienie wyboru badanych stężeń,

Wyniki

- tabelaryczne zestawienie temperatury, wilgotności i przepływu powietrza w komorze,
- tabelaryczne zestawienie danych dotyczących nominalnego i rzeczywistego stężenia w komorze,
- tabelaryczne zestawienie danych dotyczących rozmiaru cząstek, w tym danych dotyczących gromadzenia próbek analitycznych, rozkładu wielkości cząstek oraz obliczenia MMAD i σ_g ,
- tabelaryczne zestawienie danych dotyczących reakcji i poziomu stężenia dla każdego zwierzęcia (tj. zwierząt wykazujących oznaki toksyczności, w tym śmiertelność, rodzaj, ostrość, czas pojawienia się i czas trwania objawów),
- masy ciała poszczególnych zwierząt zarejestrowane w trakcie badania, data i godzina zgonu, jeśli nastąpił przed planową eutanazją, przebieg w czasie oznak toksyczności i informacje, czy były one odwracalne w przypadku każdego zwierzęcia,
- wyniki sekcji zwłok oraz badań histopatologicznych w odniesieniu do każdego zwierzęcia, jeżeli są dostępne,
- oszacowania dotyczące śmiertelności (np. LC₅₀, LD₀₁), w tym granice przedziału ufności 95 % i nachylenie (jeżeli w wyniku zastosowania danej metody oceny je uzyskano),
- relacja statystyczna, w tym oszacowanie wykładnika n (protokół C × t). Należy podać nazwę zastosowanego oprogramowania do obliczeń statystycznych,

Omówienie i interpretacja wyników

- szczególny nacisk należy położyć na opis metod zastosowanych w celu spełnienia kryteriów niniejszej metody badawczej, np. dotyczących stężenia granicznego lub rozmiaru cząstek,
- należy uwzględnić respirabilność cząstek w świetle wyników ogólnych, szczególnie jeżeli nie można było spełnić kryterium rozmiaru cząstek,
- należy przedstawić wyjaśnienie, jeżeli zaistniała konieczność humanitarnego uśmiercenia zwierząt wykazujących oznaki bólu lub objawy ostrego i przewlekłego stresu, zgodnie z kryteriami zawartymi w wytycznych OECD dotyczących humanitarnego punktu końcowego (8),
- jeżeli przerwano badania metodą opisaną w rozdziale B.52 niniejszego załącznika (4) na rzecz niniejszej metody badawczej B.2, należy podać uzasadnienie,
- w ogólnej ocenie badania należy uwzględnić spójność metod zastosowanych w celu określenia nominalnego i rzeczywistego stężenia oraz relacji między stężeniem rzeczywistym a nominalnym,
- należy uwzględnić prawdopodobną przyczynę zgonu i dominujący sposób działania (ogólnoustrojowy w porównaniu z miejscowym).

BIBLIOGRAFIA:

- (1) OECD (2009). Acute Inhalation Toxicity Testing. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 403, OECD, Paryż. Dokument dostępny pod adresem: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (2) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment nr 39, OECD, Paryż. Dokument dostępny pod adresem: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (3) Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1272/2008 z dnia 16 grudnia 2008 r. w sprawie klasyfikacji, oznakowania i pakowania substancji i mieszanin, zmieniające i uchylające dyrektywy 67/548/EWG i 1999/45/WE oraz zmieniające rozporządzenie (WE) nr 1907/2006 (Dz.U. L 353 z 31.12.2008, s. 1).
- (4) Rozdział B.52 niniejszego załącznika, Ostra toksyczność inhalacyjna – Metoda klas ostrej toksyczności.

- (5) Rozdział B.40 niniejszego załącznika – Badanie niszczenia skóry metodą in vitro: test przezskórnego oporu elektrycznego (TER).
- (6) Rozdział B.40bis niniejszego załącznika – Badanie zniszczenia skóry metodą in vitro: badanie modelu skóry ludzkiej.
- (7) OECD (2005), In Vitro Membrane Barrier Test Method For Skin Corrosion. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 435, OECD, Paryż. Dokument dostępny pod adresem: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (8) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment nr 19, OECD, Paryż. Dokument dostępny pod adresem: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (9) SOT (1992). Technical Committee of the Inhalation Specialty Section, Society of Toxicology (SOT). Recommendations for the Conduct of Acute Inhalation Limit Tests. *Fund. Appl. Toxicol.* 18: 321–327.
- (10) Phalen RF (2009). *Inhalation Studies: Foundations and Techniques*. (wyd. 2) Informa Healthcare, Nowy Jork.
- (11) Pauluhn J i Thiel A (2007). A Simple Approach to Validation of Directed-Flow Nose-Only Inhalation Chambers. *J. Appl. Toxicol.* 27: 160–167.
- (12) Zwart JHE, Arts JM, ten Berge WF, Appelman LM (1992). Alternative Acute Inhalation Toxicity Testing by Determination of the Concentration-Time-Mortality Relationship: Experimental Comparison with Standard LC50 Testing. *Reg. Toxicol. Pharmacol.* 15: 278–290.
- (13) Zwart JHE, Arts JM, Klokman-Houweling ED, Schoen ED (1990). Determination of Concentration-Time-Mortality Relationships to Replace LC50 Values. *Inhal. Toxicol.* 2: 105–117.
- (14) Ten Berge WF i Zwart A (1989). More Efficient Use of Animals in Acute Inhalation Toxicity Testing. *J. Haz. Mat.* 21: 65–71.
- (15) OECD (2009). Performance Assessment: Comparison of 403 and C x t Protocols via Simulation and for Selected Real Data Sets. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment nr 104, OECD, Paryż. Dokument dostępny pod adresem: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (16) Finney DJ (1977). *Probit Analysis*, wyd. 3. Cambridge University Press, Londyn/Nowy Jork.

DEFINICJA

Badana substancja chemiczna: jakakolwiek substancja lub mieszanina badana za pomocą niniejszej metody badawczej.

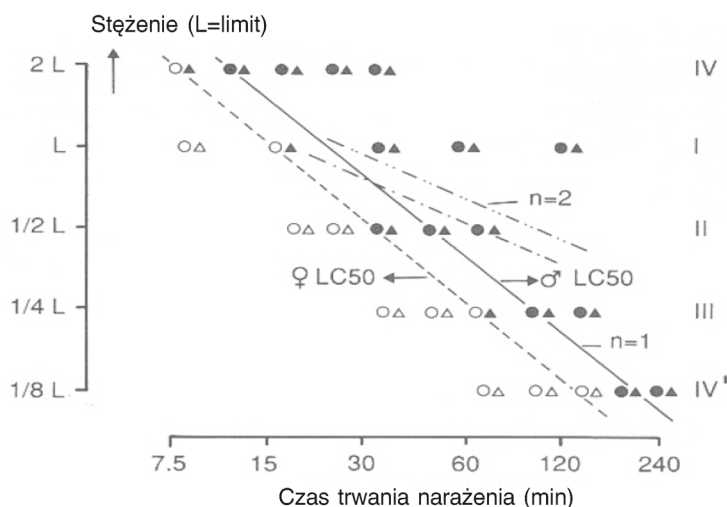
Dodatek 1

Protokół C × t

1. Alternatywą do protokołu tradycyjnego przy ocenie toksyczności inhalacyjnej może być wykonywane w procedurze sekwencyjnej badanie »stężenie × czas« (C × t) (12) (13) (14). Protokół ten najlepiej jest stosować wtedy, gdy istnieje szczególnie, wynikająca z regulacji lub powodów naukowych potrzeba przeprowadzenia badań na zwierzętach przy zastosowaniu wielu okresów trwania narażenia, np. do celów planowania działań w sytuacjach wyjątkowych czy też gospodarowania gruntami. Badania w ramach tego podejścia zaczyna się zazwyczaj od stężenia granicznego (sesja narażenia I), przy którym zwierzęta poddawane są działaniu badanej substancji chemicznej przez pięć okresów trwania (np. 15, 30, 60, 120 i 240 minut), tak aby w jednej sesji narażenia otrzymać wiele okresów narażenia (zob. rysunek 1). Jeśli stosowane jest rozporządzenie (WE) nr 1272/2008, stężenia graniczne dla gazów, par i aerozoli wynoszą odpowiednio 20 000 ppm, 20 mg/l i 5 mg/l. Poziomy te można przekroczyć tylko wtedy, jeżeli istnieje wynikająca z regulacji lub powodów naukowych potrzeba przeprowadzenia badań przy tych stężeniach (zob. pkt 37 w tekście głównym dotyczącym metody B.2).
2. W sytuacji niewystarczającej ilości lub braku informacji na temat toksyczności badanej substancji chemicznej należy przeprowadzić badanie rozpoznawcze, w którym grupy składające się z nie więcej niż 3 zwierząt każdej płci poddawane są działaniu dobranych przez kierownika badania stężeń docelowych, zazwyczaj przez 240 min.
3. Jeżeli podczas sesji narażenia I zbadane zostało stężenie graniczne i wystąpiła śmiertelność mniejsza niż 50 %, nie ma potrzeby przeprowadzania dodatkowych badań. Jeżeli istnieje wynikająca z regulacji lub powodów naukowych potrzeba ustalenia relacji stężenie/czas/reakcja przy poziomach wyższych niż wskazane stężenie graniczne, należy przeprowadzić kolejne narażenie na działanie wyższego stężenia, np. dwukrotnego stężenia granicznego (tzn. 2L na rysunku 1).
4. Jeżeli przy stężeniu granicznym obserwowana jest toksyczność, konieczne jest przeprowadzenie dodatkowych badań (badania głównego). Dodatkowe sesje narażenia przeprowadza się albo przy niższych stężeniach (sesje narażenia II, III lub IV' na rysunku 1), albo przy wyższych stężeniach przez krótszy czas (sesja narażenia IV na rysunku 1) przy zastosowaniu odpowiednio dostosowanych okresów trwania narażenia i krótszego czasu między nimi.
5. Badanie (dla stężenia wstępnego i stężeń dodatkowych) przeprowadza się przy wykorzystaniu 1 zwierzęcia każdej płci na stężenie/czas lub 2 zwierząt płci bardziej podatnej na stężenie/czas. W pewnych okolicznościach kierownik badania może zdecydować o wykorzystaniu 2 szczurów każdej płci na stężenie/czas (lub 4 zwierząt płci bardziej podatnej na stężenie/czas) (15). Dzięki wykorzystaniu dwóch osobników każdej płci na stężenie/czas zazwyczaj zmniejsza się błędy systematyczne i zmienność szacunków, zwiększa dokładność szacunków i poprawia przedział ufności dotyczący opisanego tu protokołu. Dalsze szczegóły podano w GD 39 (2).
6. W idealnym przypadku każda sesja narażenia realizowana jest jednego dnia. Umożliwia to opóźnienie kolejnego narażenia do momentu, gdy będzie można w uzasadniony sposób założyć, że zwierzęta przeżyły, i pozwala kierownikowi badania na dostosowanie docelowych stężeń i czasów trwania przy następnej sesji narażenia. Zaleca się rozpoczęcie każdej sesji narażenia od grupy, która będzie poddawana narażeniu najdłużej, tzn. od grupy poddawanej 240-minutowemu narażeniu, następnie badać grupę poddawaną narażeniu przez 120 minut i tak dalej. Przykładowo, jeśli zwierzęta w grupie 240-minutowej po 90 minutach zdychają lub wykazują poważne oznaki toksyczności (np. ekstremalne zmiany w sposobie oddychania, takie jak trudności z oddychaniem), narażenie grupy przez 120 minut nie ma sensu, ponieważ śmiertelność najprawdopodobniej wyniesie 100 %. Dla tego stężenia kierownik badania powinien zatem wybrać krótsze okresy narażenia (np. 90, 65, 45, 33 i 25 minut).
7. Stężenie w komorze należy często mierzyć w celu wyznaczenia ważonej czasowo średniej stężenia na każdy czas trwania narażenia. Tam, gdzie to możliwe, w analizie statystycznej należy użyć czasu zgonu każdego zwierzęcia (a nie czasu trwania narażenia).
8. Wyniki pierwszych czterech sesji narażenia należy przeanalizować w celu znalezienia luki w danych dla krzywej stężenie-czas (zob. rysunek 1). W przypadku gdy dopasowanie jest niewystarczające, można przeprowadzić dodatkowe narażenie (przy piątej wartości stężenia). Stężenie i czas trwania narażenia dla piątej sesji należy dobrać tak, by wypełnić tę lukę w danych.
9. Do obliczenia relacji stężenie-czas-reakcja za pomocą analizy statystycznej (16) wykorzystuje się wszystkie sesje narażenia (w tym pierwszą). O ile to możliwe, dla każdego interwału C × t należy użyć ważonej czasowo średniej stężenia i czasu trwania narażenia aż do zgonu (jeśli zgon nastąpi podczas narażenia).

Rysunek 1

Hipotetyczna ilustracja relacji stężenie-czas-śmiertelność u szczurów



Symbole bez wypełnienia = zwierzęta, które przeżyły; symbole pełne = zwierzęta padłe

Trójkąty = samice; kółka = samce

Linia ciągła = wartości LC₅₀ (zakres 7,5–240 min) dla samców przy n = 1

Linia przerywana = wartości LC₅₀ (zakres 7,5–240 min) dla samic przy n = 1

Linie kropkowane = linie hipotetycznych wartości LC₅₀ dla samców i samic, gdyby wartość n wynosiła 2 (12).

Glosariusz

Stężenie:

Czas trwania narażenia:

10. Poniżej podano przykład procedury sekwencyjnej:

Sesja narażenia I – Badanie przy stężeniu granicznym (zob. rysunek 1)

- 1 zwierzę/płeć dla relacji stężenie/czas; łącznie 10 zwierząt^(a).
- Stężenie docelowe^(b) = stężenie graniczne.
- Pięć grup zwierząt poddaje się narażeniu przy tym stężeniu docelowym przez okresy odpowiednio 15, 30, 60, 120 i 240 minut.

↓

Sesja narażenia II^(c) – Badanie główne

- 1 zwierzę/płeć na stężenie/czas; łącznie 10 zwierząt.

^(a) W razie braku dostępnych informacji na temat podatności związanej z płcią wykorzystuje się szczury obu płci, tzn. 1 zwierzę/płeć na każde stężenie. Na podstawie istniejących informacji bądź gdy podczas tej sesji narażenia stanie się oczywiste, że jedna z płci jest bardziej podatna, podczas kolejnych badań wykorzystuje się 10 zwierząt podatnej płci (2 osobniki na stężenie/czas) przy każdym poziomie stężenia.

^(b) Jeśli stosowane jest rozporządzenie (WE) nr 1272/2008, stężenia graniczne dla gazów, par i aerozoli wynoszą odpowiednio 20 000 ppm, 20 mg/l i 5 mg/l. W przypadku oczekiwanej toksyczności lub na podstawie wyników badania rozpoznawczego należy wybrać niższe stężenia początkowe. Jeżeli jest taka potrzeba, wynikająca z regulacji lub powodów naukowych, można zastosować wyższe stężenia.

^(c) Najlepiej odwlec narażenie zwierząt przy kolejnym stężeniu do momentu, gdy można rozsądnie uznać, że zwierzęta poddane poprzednio narażeniu przeżyły. Dzięki temu kierownik badania może dopasować stężenie docelowe i czas trwania dla kolejnej sesji narażenia.

— Pięć grup zwierząt poddaje się narażeniu przy niższym stężeniu ^(d) (1/2L) przez nieco dłuższe okresy (przeskalowane współczynnikiem $\sqrt{2}$, zob. rysunek 1).

↓

Sesja narażenia III – Badanie główne

— 1 zwierzę/płeć na stężenie/czas; łącznie 10 zwierząt.

— Pięć grup zwierząt poddaje się narażeniu przy niższym stężeniu ^(d) (1/4L) przez nieco dłuższe okresy (przeskalowane współczynnikiem $\sqrt{2}$, zob. rysunek 1).

↓

Sesja narażenia IV' – Badanie główne

— 1 zwierzę/płeć na stężenie/czas; łącznie 10 zwierząt.

— Pięć grup zwierząt poddaje się narażeniu przy niższym stężeniu ^(d) (1/8L) przez nieco dłuższe okresy (przeskalowane współczynnikiem $\sqrt{2}$, zob. rysunek 1).

↓ albo

Sesja narażenia IV – badanie główne

— 1 zwierzę/płeć na stężenie/czas; łącznie 10 zwierząt.

— Pięć grup zwierząt poddaje się narażeniu przy wyższym stężeniu ^(e) (2L) przez nieco krótsze okresy (przeskalowane współczynnikiem $\sqrt{2}$, zob. rysunek 1).

Opracowanie matematyczne wyników zastosowania protokołu C × t

11. W procedurze C × t obejmującej 4 lub 5 stężeń substancji i pięć czasów trwania narażenia uzyskuje się odpowiednio 20 lub 25 punktów pomiarowych. Na ich podstawie można obliczyć relację C × t za pomocą analizy statystycznej (16):

Równanie 1:

$$\text{Probit}(P) = b_0 + b_1 \ln C + b_2 \ln t$$

gdzie: C = stężenie; t = czas trwania narażenia, lub

Równanie 2:

$$\text{Reakcja} = f(C^n t)$$

gdzie: n = b_1/b_2 .

Za pomocą równania 1 można obliczyć wartość LC₅₀ dla danego czasu trwania (np. 4 godziny, 1 godzina, 30 minut, lub dowolnego czasu trwania w badanym zakresie), podstawiając P = 5 (reakcja 50 %). Należy zauważyć, że reguła Habera ma zastosowanie tylko dla n = 1. LC₀₁ można obliczyć podstawiając P = 2,67.

^(d) Kolejną kombinację stężenia i czasu trwania narażenia ustala się, biorąc jako wytyczną minimalną dawkę (stężenie × czas), która spowodowała śmiertelność podczas badania przy stężeniu początkowym (pierwsza sesja narażenia). Zazwyczaj stężenie zmniejsza się dwukrotnie (1/2L) i zwierzęta poddawane są narażeniu w nowym zakresie czasowym charakteryzującym się krótszymi odstępami między sesjami narażenia, wyznaczonymi przy zastosowaniu dzielenia geometrycznego okresów narażenia przez współczynnik 1,4 ($\sqrt{2}$, zob. pozycja literaturowa 11), zaczynając od czasu trwania odpowiadającego poziomowi minimalnej dawki śmiertelnej (czas × stężenie) zaobserwowanemu podczas pierwszego narażenia. W zilustrowanym przypadku (rysunek 1) zaobserwowano śmiertelność w sesji narażenia I po 15 minutach; czasy trwania narażenia podczas sesji II są zatem dobrane w odniesieniu do środkowego punktu 30 minut i są równe 15, 21, 30, 42 i 60 minut. Po pierwszych dwóch sesjach narażenia zdecydowanie zaleca się przedstawienie danych w formie wykresu podobnego do powyższego i sprawdzenie, czy linia obrazująca relację między stężeniem i czasem tworzy kąt 45 stopni (n = 1), ma nachylenie mniejsze (np. n = 2), czy też większe (np. n = 0,8). W tym ostatnim przypadku zdecydowanie zaleca się stosowne dostosowanie kolejnych stężeń i czasów trwania.

^(e) W niektórych przypadkach może być konieczne zwiększenie stężenia (2L) w nowym zakresie czasowym charakteryzującym się jeszcze krótszymi odstępami czasowymi, wyznaczonymi przy zastosowaniu dzielenia geometrycznego okresów narażenia przez współczynnik 1,4 ($\sqrt{2}$), zaczynając od czasu trwania odpowiadającego poziomowi minimalnej dawki śmiertelnej zaobserwowanemu podczas pierwszego narażenia. Minimalny czas trwania narażenia powinien być dłuższy niż 5 minut, maksymalny zaś nie przekraczać 8 godzin."

4) rozdziały B.7 i B.8 otrzymują brzmienie:

„B.7. 28-DNIOWE BADANIE TOKSYCZNOŚCI DOUSTNEJ WYWOŁANEJ POWTARZANYM DAWKOWANIEM U GRYZONI

WSTĘP

1. Niniejsza metoda badawcza jest równoważna dotyczącej badań wytycznej OECD nr 407 (OECD Test Guideline 407) (2008). Pierwotną dotyczącą badań wytyczną nr 407 przyjęto w 1981 r. W 1995 r. przyjęto wersję zmienioną w celu uzyskania dodatkowych informacji na podstawie badania wykorzystanych zwierząt, w szczególności w zakresie neurotoksyczności i immunotoksyczności.
2. W 1998 r. OECD podjęła działania o najwyższym priorytecie mające na celu przejrzanie istniejących wytycznych dotyczących badań i opracowanie nowych wytycznych dla odsiewania i badania substancji potencjalnie zaburzających funkcjonowanie układu hormonalnego (8). Jednym z elementów tych działań jest uzupełnienie istniejącej wytycznej OECD »Repeated dose 28-day oral toxicity study in rodents« (»28-dniowe badanie toksyczności doustnej wywołanej powtarzanym dawkowaniem u gryzoni«) (OECD TG 407) o parametry odpowiednie do wykrywania potencjału zaburzania funkcjonowania układu hormonalnego przez badane substancje chemiczne. Procedurę tę zrealizowano w ramach szeroko zakrojonego programu międzynarodowego mającego na celu zbadanie istotności i praktyczności dodatkowych parametrów, efektów zastosowania tych parametrów do substancji chemicznych o działaniu (anty)estrogenowym, działaniu (anty)androgenowym i działaniu (anty)tyroidowym, odtwarzalności wewnątrzlaboratoryjnej i międzylaboratoryjnej oraz interfeferencji nowych parametrów z parametrami wymaganymi w poprzedniej wersji OECD TG 407. Uzyskaną w ten sposób dużą ilość danych opracowano i szczegółowo oceniono w kompleksowym sprawozdaniu OECD (9). Niniejsza zaktualizowana metoda badawcza B.7 (jako metoda równoważna OECD TG 407) stanowi efekt doświadczeń i wyników uzyskanych podczas międzynarodowego programu badawczego. Niniejsza metoda badawcza umożliwi umieszczenie pewnych skutków związanych z układem hormonalnym w kontekście innych skutków toksycznych.

ZAŁOŻENIA WSTĘPNE I OGRANICZENIA

3. Przy szacowaniu i ocenie właściwości toksycznych substancji chemicznej oznaczenie toksyczności doustnej przy zastosowaniu powtarzanego dawkowania można prowadzić po uzyskaniu początkowej informacji o toksyczności na podstawie badań toksyczności ostrej. Niniejsza metoda badawcza ma na celu zbadanie skutków dla wielu różnych potencjalnych celów toksycznego działania. Dostarcza ona informacji dotyczących możliwych zagrożeń dla zdrowia, które mogą się pojawiać się pod wpływem wielokrotnego narażenia przez względnie ograniczony okres, w tym skutków dla układu nerwowego, immunologicznego i hormonalnego. W odniesieniu do tych punktów końcowych metoda powinna służyć do identyfikacji związków chemicznych o potencjale neurotoksycznym, co może dawać podstawy do dalszego dogłębnego badania tego aspektu, jak również związków chemicznych zakłócających fizjologię tarczycy. Metoda ta może również dostarczać danych na temat substancji chemicznych, które wpływają na męskie lub żeńskie narządy rozrodcze u młodych, dorosłych osobników zwierząt, i których działanie może wskazywać na skutki dla układu immunologicznego.
4. Wyniki badań wykonanych niniejszą metodą badawczą B.7 należy wykorzystywać do identyfikacji zagrożeń i oceny ryzyka. Wyniki uzyskane za pomocą parametrów związanych z układem hormonalnym należy rozpatrywać w kontekście dokumentu »OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals« (»Ramy koncepcyjne OECD dotyczące testowania i oceny substancji chemicznych zaburzających funkcjonowanie układu hormonalnego«) (11). Metoda obejmuje podstawowe badanie toksyczności wywołanej powtarzanym dawkowaniem, które można przeprowadzić w przypadku substancji chemicznych, dla których nie ma obowiązku wykonania badania 90-dniowego (np. wtedy, gdy wielkość produkcji nie przekracza pewnych limitów) lub jako wstęp do badania długoterminowego. Czas trwania narażenia powinien wynosić 28 dni.
5. Wyniki międzynarodowego programu walidacji parametrów odpowiednich do potencjalnego wykrywania zaburzania funkcjonowania układu hormonalnego przez badaną substancję chemiczną pokazały, że jakość danych uzyskanych za pomocą niniejszej metody badawczej B.7 zależy w dużym stopniu od doświadczenia laboratorium prowadzącego badanie. Dotyczy to w szczególności histopatologicznego określenia cyklicznych zmian w żeńskich narządach rozrodczych oraz wyznaczania masy małych, trudnych do wycięcia narządów hormonozależnych. Opracowano wytyczne dotyczące badań histopatologicznych (19). Są one dostępne na publicznej stronie internetowej OECD poświęconej wytycznym dotyczącym badań. Wytyczne mają na celu wsparcie patologów w badaniach i zwiększenie czułości oznaczenia. Znalezione szereg różnych parametrów, które wskazują na toksyczność związaną z układem hormonalnym, i zostały one włączone do niniejszej metody badawczej. Parametry, dla których brakowało dostępnych danych mających na celu wykazanie ich użyteczności lub dla których w toku programu walidacji uzyskano jedynie słabe dowody na ich przydatność do wykrywania substancji zaburzających funkcjonowanie układu hormonalnego, zaproponowano jako opcjonalne punkty końcowe (zob. dodatek 2).
6. Na podstawie danych otrzymanych w procesie walidacji należy podkreślić, że czułość tego testu jest niewystarczająca do identyfikacji »wszystkich substancji o działaniu (anty)androgenowym lub (anty)estrogenowym (9). Niniejszej metody badawczej nie stosuje się na takim etapie życia, na którym występuje największa wrażliwość na zaburzanie funkcjonowania układu hormonalnego. Mimo to podczas procesu walidacji za pomocą niniejszej metody badawczej zidentyfikowano substancje, które w małym i dużym stopniu zaburzają funkcjonowanie tarczycy, jak również substancje silnie i średnio zaburzające funkcjonowanie układu hormonalnego poprzez receptory androgenowe i estrogenowe, jednak w większości przypadków nie udało się zidentyfikować substancji zaburzających funkcjonowanie układu hormonalnego słabo wpływających na receptory estrogenowe i androgenowe. Nie można jej zatem uznać za test przesiewowy dla potencjału zaburzania funkcjonowania układu hormonalnego.
7. A zatem brak skutków związanych z tymi sposobami działania nie może być dowodem na brak działania na układ hormonalny. Nie można zatem scharakteryzować substancji w zakresie skutków związanych z układem hormonalnym tylko na podstawie wyników niniejszej metody badawczej – powinna ona być stosowana w ramach podejścia opartego na wadze dowodów, obejmującego wszystkie istniejące dane na temat substancji chemicznej, prowadzącego do scharakteryzowania potencjału zaburzania funkcjonowania układu hormonalnego. Z tego powodu decyzje regulacyjne dotyczące zaburzania funkcjonowania układu hormonalnego (charakterystyka substancji) powinny być oparte na ustaleniach wyników z zastosowania szerokiego podejścia, nie zaś podejmowane tylko na podstawie wyników zastosowania niniejszej metody badawczej.

8. Uznaje się, że wszystkie procedury oparte na wykorzystaniu zwierząt będą przeprowadzane zgodnie z lokalnymi normami dotyczącymi utrzymania zwierząt; opisy ich utrzymania i poddawania działaniu substancji podane poniżej stanowią standardy minimalne, a przepisy lokalne, jeśli są bardziej rygorystyczne, mają przed nimi pierwszeństwo. Dalsze wskazówki dotyczące humanitarnego traktowania zwierząt podano w dokumencie OECD (14).
9. Definicje użytych pojęć podano w dodatku 1.

ZASADA BADANIA

10. Badana substancja chemiczna jest codziennie podawana doustnie w stopniowanych dawkach kilku grupom zwierząt doświadczalnych – jeden poziom dawkowania na grupę przez okres 28 dni. Podczas okresu dawkowania każdego dnia zwierzęta są dokładnie obserwowane w celu wykrycia oznak toksyczności. Zwierzęta, które padną lub zostaną poddane eutanazji w czasie trwania badania, poddawane są sekcji zwłok, a przy zakończeniu badania zwierzęta, które przeżyły, również są uśmiercane i poddawane sekcji zwłok. W 28-dniowym badaniu można uzyskać informacje na temat skutków powtarzanego narażenia drogą doustną i określić potrzebę przeprowadzenia dalszych badań obejmujących dłuższy okres. Można również uzyskać informacje dotyczące wyboru stężeń do badań długoterminowych. Dane otrzymane w drodze zastosowania niniejszej metody badawczej powinny umożliwić scharakteryzowanie toksyczności badanej substancji chemicznej, określenie związku dawka-odpowiedź oraz wyznaczenie poziomu dawkowania, przy którym nie obserwuje się szkodliwych zmian (NOAEL).

OPIS METODY

Dobór gatunków zwierząt

11. Preferowanym gatunkiem gryzonia jest szczur, choć dopuszcza się wykorzystywanie innych gatunków gryzoni. W przypadku gdy parametry określone w niniejszej metodzie badawczej B.7 badane są z wykorzystaniem innego gatunku gryzoni, należy podać uzasadnienie. Mimo że z biologicznego punktu widzenia jest możliwe, że zwierzęta innych gatunków będą reagować na substancje toksyczne w podobny sposób do szczurów, wykorzystanie gatunków mniejszych zwierząt może spowodować zwiększenie zmienności wyników z powodu trudności technicznych z sekcją mniejszych narządów. Szczur był jedynym gatunkiem wykorzystywanym w międzynarodowym programie walidacyjnym dotyczącym substancji zaburzających funkcjonowanie układu hormonalnego. Zaleca się wykorzystanie zdrowych, młodych, dorosłych zwierząt pochodzących ze szczepów powszechnie wykorzystywanych w laboratoriach. Samice powinny być nieródkami i nie mogą być w ciąży. Dawkowanie powinno się rozpocząć jak najszybciej po odsadzeniu od matki, a w każdym przypadku przed ukończeniem dziewięciu tygodni. W momencie rozpoczęcia badania odchylenia masy ciała wśród wykorzystywanych zwierząt powinny być jak najniższe i nie powinny przekraczać $\pm 20\%$ średniej masy ciała u każdej z płci. Kiedy przeprowadza się badanie z zastosowaniem powtarzanego dawkowania doustnego jako badanie wstępne do badania długoterminowego, w obu badaniach należy użyć zwierząt tego samego szczepu, pochodzących z tego samego źródła.

Warunki przetrzymywania i karmienia

12. Wszystkie procedury powinny być zgodne z lokalnymi normami utrzymywania zwierząt laboratoryjnych. Temperatura w pomieszczeniu, w którym przetrzymuje się zwierzęta doświadczalne, powinna wynosić $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$). Wilgotność względna, poza okresem sprzątania pomieszczenia, powinna wynosić co najmniej 30% i raczej poniżej 70% , należy starać się ją utrzymać na poziomie $50\text{--}60\%$. Oświetlenie powinno być sztuczne, w cyklu 12 godzin światła, 12 godzin ciemności. Do karmienia można stosować konwencjonalne pasze laboratoryjne z nieograniczonym dostępem do wody pitnej. Na wybór diety może mieć wpływ potrzeba zapewnienia odpowiedniej domieszki badanej substancji chemicznej przy podawaniu w ramach niniejszej metody. Zwierzęta należy przetrzymywać razem, w małych grupach składających się z osobników tej samej płci; można je przetrzymywać pojedynczo, jeśli jest to uzasadnione z naukowego punktu widzenia. W przypadku przetrzymywania w grupach w jednej klatce należy umieszczać nie więcej niż pięć zwierząt.
13. Paszę należy regularnie analizować pod kątem obecności zanieczyszczeń. Próbkę paszy należy zachować do momentu ukończenia sprawozdania.

Przygotowanie zwierząt

14. Zdrowe młode dorosłe osobniki zwierząt są losowo przypisane do grup kontrolnych oraz grup poddawanych działaniu substancji. Klatki należy rozmieścić w taki sposób, aby zminimalizować potencjalny wpływ ich układu. Zwierzęta są identyfikowane jednoznacznie i przetrzymywane w klatkach przez co najmniej pięć dni przed rozpoczęciem badania z poddawaniem działaniu substancji, żeby umożliwić aklimatyzację do warunków laboratoryjnych.

Przygotowanie dawek

15. Badaną substancję chemiczną podaje się za pomocą sondy bądź wraz z pokarmem lub wodą pitną. Metoda podawania drogą doustną zależy od celu badania oraz właściwości fizycznych/chemicznych/toksykokinetycznych badanej substancji chemicznej.
16. W razie potrzeby badaną substancję chemiczną rozpuszcza się lub sporządza się jej zawiesinę w odpowiednim nośniku. Zaleca się, aby – jeżeli to możliwe – najpierw rozważyć użycie wodnego roztworu/zawiesiny, następnie roztworu/emulsji w oleju (np. oleju kukurydzianym), a dopiero potem roztworu w innych nośnikach. W przypadku nośników innych niż woda charakterystyka toksyczna nośnika musi być znana. Należy określić stabilność badanej substancji chemicznej w nośniku.

PROCEDURA**Liczba i płęć zwierząt**

17. Dla każdego poziomu dawkowania należy wykorzystać co najmniej 10 zwierząt (pięć samic i pięć samców). Jeżeli planowana jest eutanazja zwierząt w trakcie trwania doświadczenia, ich liczba powinna zostać powiększona o liczbę zwierząt, które mają być poddane eutanazji przed zakończeniem badania. Należy rozważyć włączenie dodatkowej satelitarnej grupy 10 zwierząt (po 5 każdej płci) do grupy kontrolnej i grupy otrzymującej najwyższe dawki w celu obserwacji odwracalności, trwałości lub opóźnionego występowania skutków toksycznych przez co najmniej 14 dni po zakończeniu podawania substancji.

Dawkowanie

18. Zasadniczo należy wykorzystać co najmniej trzy grupy badane i grupę kontrolną, jednak jeżeli z oceny innych danych należałoby oczekiwać braku objawów przy dawce 1 000 mg/kg masy ciała/dzień, można przeprowadzić badanie graniczne. Jeżeli nie są dostępne odpowiednie dane, można wykonać badanie ustalające zakres (z wykorzystaniem zwierząt tego samego szczepu, pochodzących z tego samego źródła) w celu określenia dawek, które mają być zastosowane. Z wyjątkiem poddawania działaniu badanej substancji chemicznej, zwierzęta z grupy kontrolnej należy traktować w taki sam sposób jak zwierzęta z grup badanych. Jeżeli przy podawaniu badanej substancji chemicznej jest stosowany nośnik, grupa kontrolna powinna otrzymać największą użytą objętość nośnika.
19. Poziomy dawkowania należy dobierać przy uwzględnieniu wszelkich istniejących danych o toksyczności i danych (toksyko)kinetycznych dostępnych dla badanej substancji chemicznej lub powiązanych związków chemicznych. Należy wybrać taki najwyższy poziom dawkowania, który powoduje oznaki toksyczności, ale nie zgon lub silne cierpienie. Następnie należy dobierać poziomy dawkowania w sekwencji malejącej w taki sposób, aby ukazać wszystkie reakcje powiązane z dawkowaniem i brak obserwowanych szkodliwych zmian przy najmniejszym poziomie dawkowania (NOAEL). Często do ustalenia malejących poziomów dawkowania optymalne jest zastosowanie poziomów dawkowania różniących się od dwu- do czterokrotnie, a zamiast stosować bardzo odległe (np. różniące się więcej niż 10-krotnie) poziomy dawkowania, często lepiej jest dodać czwartą grupę badaną.
20. Jeśli obserwowana jest ogólna toksyczność (np. zmniejszenie masy ciała, wpływ na wątrobę, serce, płuca lub nere itp.) bądź inne zmiany, które nie muszą być efektami toksycznymi (np. zmniejszone pobieranie pokarmu, powiększenie wątroby), interpretacji obserwowanych skutków dla punktów końcowych w postaci wpływu na układ immunologiczny, neurologiczny lub hormonalny należy dokonywać ostrożnie.

Badanie graniczne

21. Jeżeli badanie przy jednym poziomie dawkowania równym co najmniej 1 000 mg/kg masy ciała/dzień lub, w przypadku podawania w pożywieniu lub wodzie pitnej, równoważnemu procentowi w pożywieniu lub wodzie pitnej (określonymu na podstawie masy ciała), przy zastosowaniu procedur opisanych dla tego badania, nie wywołuje widocznych oznak toksyczności i jeżeli na podstawie danych dotyczących strukturalnie powiązanych związków nie należałoby spodziewać się toksyczności, pełne badanie przy użyciu trzech poziomów dawkowania może nie być konieczne. Takie badanie graniczne stosuje się z wyjątkiem przypadków, w których narażenie ludzi wskazuje na konieczność użycia wyższego poziomu dawkowania.

Podawanie dawek

22. Zwierzętom podaje się badaną substancję chemiczną codziennie, siedem dni w tygodniu przez okres 28 dni. Gdy badana substancja chemiczna jest podawana przez sondę, należy ją podawać zwierzętom w pojedynczej dawce przy użyciu sondy żołądkowej lub odpowiedniej kaniuli intubacyjnej. Maksymalna objętość cieczy, jaką można podać jednorazowo, zależy od wielkości badanego zwierzęcia. Objętość ta nie powinna przekraczać 1 ml/100 g masy ciała, oprócz roztworów wodnych, w przypadku których można zastosować 2 ml/100 g masy ciała. Z wyjątkiem drażniących i żrących substancji chemicznych, dla których zazwyczaj przy wyższych stężeniach występują zaostrezone objawy, należy zminimalizować zmienność objętości substancji badanej przez dostosowanie stężenia tak, aby przy wszystkich poziomach dawkowania objętość była stała.
23. W przypadku substancji chemicznych podawanych w pokarmie lub wodzie pitnej ważne jest dopilnowanie, aby takie ilości badanej substancji chemicznej nie zakłócały normalnego odżywiania ani bilansu wodnego organizmu. Przy podawaniu badanej substancji chemicznej wraz z pokarmem można zastosować stałe stężenie w pokarmie (ppm) lub też stały poziom dawki w odniesieniu do masy ciała zwierzęcia; trzeba podać zastosowany wariant. W przypadku podawania substancji chemicznej przez sondę dawkę należy podawać każdego dnia o zbliżonej porze i w razie konieczności modyfikować, aby utrzymać stały poziom dawkowania w odniesieniu do masy ciała zwierzęcia. W przypadku gdy badanie z powtarzanym dawkowaniem jest przeprowadzane jako badanie wstępne do badania długoterminowego, należy w obu badaniach stosować podobną dietę.

Obserwacje

24. Okres obserwacji powinien wynosić 28 dni. Zwierzęta z grupy satelitarnej przeznaczone do obserwacji uzupełniających należy trzymać co najmniej 14 dni bez podawania substancji w celu wykrycia opóźnionego pojawienia się, utrzymywania lub ustąpienia oznak toksyczności.
25. Ogólne obserwacje kliniczne należy przeprowadzać co najmniej raz dziennie, najlepiej o tej samej porze każdego dnia, biorąc pod uwagę szczytowy okres występowania przewidywanych objawów po dawkowaniu. Należy rejestrować stan zdrowia zwierząt. Co najmniej dwa razy dziennie wszystkie zwierzęta poddaje się obserwacjom pod kątem zachorowalności i śmiertelności.

26. Dla wszystkich zwierząt należy przeprowadzać szczegółowe obserwacje kliniczne: jeden raz przed pierwszym narażeniem (w celu umożliwienia porównania badanych zwierząt), a następnie co najmniej raz w tygodniu. Obserwacji należy dokonywać poza klatką zwierzęcia, najlepiej w warunkach standardowych i za każdym razem o tej samej porze. Obserwacje należy starannie odnotowywać, najlepiej za pomocą systemów punktacji wyraźnie określonych przez laboratorium badawcze. Należy dołożyć starań w celu dopilnowania, aby odchylenia w warunkach badania były minimalne, preferowane jest prowadzenie obserwacji przez osoby, które nie wiedzą, jaka substancja jest podawana. Odnotowane objawy powinny obejmować między innymi zmiany w skórze, futrze, oczach, błonach śluzowych, wystąpienie wydzielin i wydaliny oraz aktywność autonomicznej części układu nerwowego (np. łzawienie, piloerekcję, rozmiar źrenicy, nietypowy rytm oddychania). Należy odnotować także zmiany w sposobie chodzenia, postawie i reakcji na dotyk, jak również obecność ruchów klonicznych lub tonicznych, zachowań stereotypowych (np. nadmierne czyszczenie się, powtarzające się krącenie w kółko) oraz dziwnych zachowań (np. samookaleczanie się, chodzenie do tyłu) (2).
27. W czwartym tygodniu narażenia należy przeprowadzić ocenę reaktywności sensorycznej na różnego typu bodźce (2) (np. bodźce słuchowe, wzrokowe i proprioceptywne) (3) (4) (5), ocenę siły uchwytu (6) i aktywności motorycznej (7). Dalsze szczegółowe informacje na temat procedur, jakie można zastosować, podano w odnośnych źródłach literaturowych. Można jednak zastosować również procedury inne niż te podane w bibliografii.
28. Obserwacje czynnościowe przeprowadzane w czwartym tygodniu narażenia można pominąć, gdy badanie prowadzone jest jako badanie wstępne do późniejszego (90-dniowego) badania toksyczności podprzewlekłej. W takim przypadku obserwacje czynnościowe należy zamieścić w tym badaniu uzupełniającym. Z drugiej strony, dostępność danych dotyczących obserwacji czynnościowych z badania z powtarzaniem dawkowaniem może zwiększyć możliwości doboru poziomów dawkowania do celów późniejszego badania toksyczności podprzewlekłej.
29. Wyjątkowo można pominąć obserwacje czynnościowe również w odniesieniu do grup, które oprócz tego przejawiają oznaki toksyczności nasilone na tyle, że mogłyby znacznie zakłócić wykonanie badania czynnościowego.
30. Podczas sekcji zwłok można (opcjonalnie) określić cykl estrogenowy wszystkich samic za pomocą rozmazów śluzówki pochwy. Z tych obserwacji uzyskuje się informacje dotyczące etapu cyklu estrogenowego w momencie uśmiercenia zwierzęcia oraz dane do oceny histologicznej tkanek wrażliwych na działanie estrogenów [zob. wytyczne dotyczące histopatologii (19)].

Masa ciała i spożycie pokarmu/wody

31. Wszystkie zwierzęta należy ważyć przynajmniej raz na tydzień. Pomiarów spożycia pokarmu należy dokonywać nie rzadziej niż co tydzień. Jeśli badana substancja chemiczna jest podawana w wodzie pitnej, należy mierzyć również spożycie wody, nie rzadziej niż raz w tygodniu.

Hematologia

32. Pod koniec okresu badania należy przeprowadzić następujące analizy hematologiczne: hematokryt, stężenie hemoglobiny, liczba erytrocytów, liczba retikulocytów, całkowita i różnicowa liczba leukocytów, liczba płytek krwi i pomiar czasu krzepnięcia krwi. Jeśli badana substancja chemiczna lub jej potencjalne metabolity mają właściwości utleniające lub podejrzewa się, że mogą mieć takie właściwości, należy również przeprowadzić inne oznaczenia, w tym stężenia methemoglobiny i ciałek Heinzów.
33. Próbkę krwi należy pobierać z wyznaczonego miejsca tuż przed eutanazją zwierząt lub jako element jej procedury, i przechowywać w odpowiednich warunkach. Zwierzęta w noc przed eutanazją nie powinny otrzymywać pokarmu (1).

Biochemia kliniczna

34. Oznaczenia parametrów biochemii klinicznej w celu zbadania głównych skutków toksycznych w tkankach, a w szczególności skutków dla nerek i wątroby, należy wykonać na próbkach krwi pobranych od każdego zwierzęcia tuż przed eutanazją lub jako element jej procedury (z wyjątkiem zwierząt, które przed zakończeniem badania znalazły się w stanie agonalnym lub zostały uśmiercone). Badania osocza i surowicy muszą obejmować oznaczenia sodu, potasu, glukozy, cholesterolu całkowitego, mocznika, kreatyniny, całkowitego białka i albuminy, co najmniej dwóch enzymów wskazujących na stan komórek wątroby (takich jak aminotransferaza alaninowa, aminotransferaza asparaginianowa, fosfataza alkaliczna, transpeptydaza gammaglutamylowa i dehydrogenaza glutaminianowa) oraz kwasów żółciowych. W pewnych okolicznościach przydatnych informacji mogą dostarczyć pomiary dodatkowych enzymów (pochodzenia wątrobowego lub innego) oraz bilirubiny.
35. Opcjonalnie można w ciągu ostatniego tygodnia badań przeprowadzić następujące oznaczenia analityczne w moczu przy użyciu zebranej w określonym czasie objętości moczu: wygląd, objętość, osmolalność lub masa właściwa, pH, białko, glukoza i krew/komórki krwi.

(1) W odniesieniu do niektórych pomiarów dotyczących surowicy i osocza, w szczególności dla glukozy, zaleca się wstrzymanie podawania pokarmu przez noc. Zalecenie to wynika głównie z faktu, że zwiększona zmienność, którą nieuchronnie powoduje brak wstrzymania podawania pokarmu, często maskuje bardziej subtelne skutki, co utrudnia interpretację wyników. Z drugiej strony jednak wstrzymanie podawania pokarmu przez noc może wpływać na ogólny metabolizm zwierząt i w szczególności w badaniach żywieniowych może zakłócać działanie badanej substancji chemicznej. Jeżeli przyjęte jest wstrzymanie podawania pożywienia przez całą noc, biochemiczne oznaczenia kliniczne należy wykonać po przeprowadzeniu obserwacji czynnościowych w czwartym tygodniu badania.

36. Ponadto należy rozważyć zastosowanie do badań osocza lub surowicy znaczników ogólnego uszkodzenia tkanek. Inne oznaczenia, które należy wykonać, jeżeli znane właściwości badanej substancji chemicznej mogą wpływać na pokrewne profile metaboliczne lub podejrzewa się taki wpływ, obejmują oznaczenia wapnia, fosforanów, trójglicerydów, poszczególnych hormonów i pseudocholinesterazy. Należy je określić dla substancji chemicznych należących do niektórych klas lub indywidualnie w każdym przypadku.
37. Mimo że w toku międzynarodowej oceny punktów końcowych związanych z układem hormonalnym nie wykazano oczywistych zalet oznaczania hormonów tarczycy (T_3 , T_4) i TSH, użyteczne może być zachowanie próbek osocza lub surowicy w celu zmierzenia poziomów T_3 , T_4 i TSH (opcjonalnie), jeżeli istnieją przypuszczenia co do skutków dla osi przysadkowo-tarczycowej. Próbkę tę można przechowywać w stanie zamrożonym, w temperaturze $-20\text{ }^\circ\text{C}$. Na zmienność i wartości bezwzględne stężeń przy oznaczaniu hormonów mogą mieć wpływ następujące czynniki:
- czas uśmiercenia zwierzęcia w związku z dobową zmiennością stężeń hormonów,
 - metoda uśmiercenia zastosowana w celu uniknięcia zbędnego stresu dla zwierząt mogącego wpłynąć na stężenia hormonów,
 - zestawy do oznaczania hormonów, których krzywe standardowe mogą się różnić.
- Wyniki identyfikacji substancji chemicznych działających na tarczycę uzyskane na podstawie analizy histopatologicznej są bardziej wiarygodne niż identyfikacja na podstawie poziomów hormonów.
38. Próbkę osocza przeznaczoną konkretnie do oznaczenia poziomu hormonów należy pobierać o porównywalnej porze dnia. Zaleca się, aby na podstawie zmian histopatologicznych w tarczycy rozważyć oznaczenie T_3 , T_4 i TSH. Wartości liczbowe uzyskane w toku analizy stężeń hormonów różnią się w zależności od zastosowanego dostępnego w handlu zestawu testowego. Uzyskanie kryteriów w oparciu o jednorodne dane historyczne może zatem być niemożliwe. Alternatywnie laboratoria powinny dążyć do utrzymywania kontrolnych współczynników zmienności poniżej 25 w odniesieniu do T_3 i T_4 , a w odniesieniu do TSH – poniżej 35. Wszystkie stężenia zapisuje się w ng/ml.
39. Jeżeli historyczne dane odniesienia są niewystarczające, należy rozważyć oznaczenie zmiennych hematologicznych i biochemii klinicznej przed rozpoczęciem podawania dawek lub, lepiej, w grupie zwierząt niebędących zwierzętami doświadczalnymi.

PATOLOGIA

Pełne rozpoznanie histopatologiczne

40. Wszystkie zwierzęta w badaniu podlegają szczegółowemu pełnemu rozpoznaniu histopatologicznemu, które obejmuje staranne badanie zewnętrznej powierzchni ciała, wszystkich otworów ciała, jamy czaszkowej, klatki piersiowej i jamy brzusznej oraz ich zawartości. Wątroba, nerki, nadnercza, jądra, najądrza, prostata + pęcherzyki nasienne wraz z gruczołami koagulującymi jako całość, grasica, śledziona, mózg i serce wszystkich zwierząt (z wyjątkiem tych, które przed zakończeniem badania znalazły się w stanie agonalnym lub zostały uśmiercone) powinny być odpowiednio okrojone z wszelkich przylegających tkanek i należy niezwłocznie po sekcji zmierzyć ich mokrą masę w celu zapobieżenia wyschnięciu. Należy zachować ostrożność przy okrajaniu zespołu prostaty, aby uniknąć przebicia wypełnionych płynem pęcherzyków nasiennych. Alternatywnie można okroić i zważyć pęcherzyki nasienne i prostatę po utrwaleniu.
41. Ponadto opcjonalnie można zważyć kolejne dwa zespoły tkanek niezwłocznie po przeprowadzeniu sekcji w celu uniknięcia wyschnięcia: parę jajników (mokra masa) i macicę wraz z szyjką (wytyczne w zakresie wycinania i przygotowania tkanek macicy w celu pomiaru masy podane są w OECD TG 440 (18)).
42. Masę tarczycy można (opcjonalnie) określić po utrwaleniu. Należy zachować dużą ostrożność przy okrawaniu i wykonywać je dopiero po utrwaleniu, w celu uniknięcia uszkodzenia tkanek. Mogłoby ono zakłócić analizę histopatologiczną.
43. Następujące tkanki należy zachować w roztworze utrwalającym najbardziej odpowiednim zarówno dla rodzaju tkanki, jak i planowanego późniejszego badania histopatologicznego (zob. punkt 47): wszystkie makroskopowe zmiany patologiczne, mózg (reprezentatywne regiony, w tym kresomózgowie, mózdzek i most), rdzeń kręgowy, oko, żołądek, jelito cienkie i grube (w tym kępki Peyera), wątrobę, nerki, nadnercza, śledzionę, serce, grasiec, tarczycę, tchawicę i płuca (zakonserwowane przez napełnienie środkiem utrwalającym i następnie zanurzenie), gonady (jądra i jajniki), ściwo narządy dodatkowe (macicę i szyjkę macicy, najądrza, prostatę + pęcherzyki nasienne wraz z gruczołami koagulującymi), pochwę, pęcherz moczowy, węzły chłonne [poza najbliższym węzłem chłonnym należy pobrać inny węzeł w zależności od doświadczenia laboratorium (15)], nerw obwodowy (kulszowy lub piszczelowy), najlepiej w bliskiej odległości od mięśnia, mięsień szkieletowy i kość szkieletową wraz ze szpikiem kostnym (wycinek lub ewentualnie świeżo pobrany szpik kostny). Zaleca się utrwalenie jąder poprzez zanurzenie w utrwalaczu Bouina lub zmodyfikowanym utrwalaczu Davidsona (16) (17). Błonę białawą trzeba delikatnie i płytko przekłuć igłą na obu biegunach narządu w celu umożliwienia szybkiego przeniknięcia płynu utrwalającego do utrwalacza. Wyniki badań klinicznych i innych testów mogą wskazać na konieczność zbadania dodatkowych tkanek. Organy uznane w oparciu o znane właściwości badanej substancji chemicznej za prawdopodobne organy docelowe także należy zachować.

44. Ważnych wskazówek co do efektów związanych z układem hormonalnym mogą dostarczyć badania następujących tkanek: gonad (jajników i jąder), płciowych narządów dodatkowych (macicy wraz z szyjką, najądrzy, pęcherzyków nasiennych z gruczołami koagulacyjnymi, części grzbietowo-bocznej i brzusznej prostaty), pochwy, przysadki mózgowej, męskich gruczołów mlekowych, tarczycy i gruczołu nadnerczowego. Zmiany w męskich gruczołach mlekowych nie są zbyt dobrze udokumentowane, ale parametr ten może być bardzo czuły na substancje o działaniu estrogenowym. Badania organów/tkanek niewymienionych w pkt 43 są opcjonalne (zob. dodatek 2).
45. W wytycznych dotyczących histopatologii (19) podano dodatkowe informacje dotyczące wycinania, utrwalania, dzielenia i histopatologii tkanek układu hormonalnego.
46. W międzynarodowym programie badawczym uzyskano dowody na to, że nieznaczne skutki działania na układ hormonalny substancji chemicznych o niewielkiej sile działania na homeostazę hormonów płciowych można wykryć poprzez zakłócenie synchronizacji cyklu estrogenowego w różnych tkankach, nie zaś poprzez bezpośrednie zmiany histopatologiczne w żeńskich organach płciowych. Mimo że definitywne dowody na takie oddziaływanie nie są znane, zaleca się uwzględnienie dowodów na możliwą desynchronizację cyklu estrogenowego w interpretacji badań histopatologicznych jajników (komórek pęcherzykowych, osłonkowych i warstwy ziarnistej pęcherzyka Graffa), macicy, szyjki macicy oraz pochwy. W porównaniu tym można uwzględnić również etap cyklu estrogenowego określony na podstawie rozmazów śluzówki pochwy, o ile wykonano taką ocenę.

Histopatologia

47. Pełne badanie histopatologiczne należy przeprowadzić na zakonserwowanych narządach i tkankach wszystkich zwierząt z grupy kontrolnej i grupy otrzymującej najwyższe dawki. Badania te powinny być rozciągnięte na wszystkie inne grupy badane, jeśli w grupie otrzymującej najwyższe dawki obserwuje się zmiany związane z działaniem substancji.
48. Wszystkie makroskopowe zmiany patologiczne muszą być zbadane.
49. Jeśli wykorzystuje się grupę satelitarną, należy przeprowadzić badanie histopatologiczne tych tkanek i organów, w których – w grupach otrzymujących substancję badaną – stwierdzono skutki podania substancji.

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Dane

50. Należy przedstawić dane dotyczące poszczególnych zwierząt. Ponadto wszystkie dane należy zestawić w postaci tabeli, przedstawiając w odniesieniu do każdej badanej grupy liczbę zwierząt na początku badania, liczbę zwierząt padłych w trakcie trwania badania lub poddanych eutanazji z przyczyn humanitarnych wraz z określeniem czasu zgonu lub eutanazji, liczbę zwierząt wykazujących oznaki toksyczności, opis obserwowanych oznak toksyczności, w tym czas ich pojawienia się, czas trwania, nasilenie wszelkich skutków toksycznych, liczbę zwierząt wykazujących zmiany patologiczne, typ takich zmian, ich nasilenie oraz procent zwierząt wykazujących każdy typ zmiany.
51. O ile to możliwe, wyniki liczbowe należy poddawać ocenie za pomocą właściwych i ogólnie przyjętych metod statystycznych. Przy porównywaniu skutków dla różnych dawek należy unikać stosowania wielokrotnego porównywania testem t-Studenta. Metody statystyczne należy wybrać podczas planowania badania.
52. Proponuje się, aby do celów kontroli jakości zbierać historyczne dane kontrolne i obliczać współczynniki zmienności dla danych liczbowych, szczególnie w odniesieniu do parametrów związanych z wykrywaniem substancji zakłócających funkcjonowanie układu hormonalnego. Dane te można wykorzystać do celów porównawczych przy ocenie bieżących badań.

Sprawozdanie z badania

53. Sprawozdanie z badania musi zawierać następujące informacje:

Badana substancja chemiczna

- cechy fizyczne, czystość i własności fizykochemiczne,
- dane identyfikacyjne.

Nośnik (w stosownych przypadkach)

- uzasadnienie wyboru nośnika (jeżeli jest inny niż woda).

Zwierzęta badane

- wykorzystany gatunek/szczep,
- liczba, wiek i płeć zwierząt,
- źródło, warunki przebywania, pokarm itp.,
- masa ciała poszczególnych zwierząt na początku badania,
- uzasadnienie wyboru gatunku, jeśli jest inny niż szczur.

Warunki badania

- uzasadnienie wyboru poziomu dawek,
- szczegóły dotyczące postaci użytkowej badanej substancji chemicznej/przygotowania pokarmu, osiągnięte stężenie, stabilność i jednorodność preparatu,
- szczegóły dotyczące podawania badanej substancji chemicznej,
- wskaźnik konwersji stężenia badanej substancji chemicznej w pokarmie/wodzie pitnej (ppm) do dawki rzeczywistej (mg/kg masy ciała/dzień), jeśli ma to zastosowanie,
- szczegółowe informacje na temat jakości pokarmu i wody.

Opcjonalne badane punkty końcowe

- lista opcjonalnych badanych punktów końcowych.

Wyniki

- masa ciała/zmiany masy ciała,
- dane dotyczące spożycia pokarmu oraz wody, w stosownych przypadkach,
- dane dotyczące efektu toksycznego według płci i poziomu dawki, w tym oznaki toksyczności,
- rodzaj, nasilenie i czas trwania obserwowanych objawów klinicznych (tak odwracalnych, jak i nieodwracalnych),
- oceny aktywności sensorycznej, siły uchwytu i aktywności motorycznej,
- badania hematologiczne wraz z odpowiednimi wartościami odniesienia,
- badania biochemii klinicznej wraz z odpowiednimi wartościami odniesienia,
- masa ciała w momencie eutanazji oraz dane dotyczące masy organów,
- wyniki sekcji zwłok,
- szczegółowy opis wszystkich wyników badań histopatologicznych,
- dane dotyczące wchłaniania, jeśli są dostępne,
- w stosownych przypadkach statystyczne opracowanie wyników.

*Omówienie wyników.**Wnioski.*

Dodatek 1

DEFINICJE

Działanie androgenowe jest to zdolność substancji chemicznej do działania przypominającego działanie naturalnego hormonu androgenowego (np. testosteronu) w organizmach ssaków.

Działanie antyandrogenowe jest to zdolność substancji chemicznej do hamowania działania naturalnego hormonu androgenowego (np. testosteronu) w organizmach ssaków.

Działanie antyestrogenowe jest to zdolność substancji chemicznej do hamowania działania naturalnego hormonu estrogenowego (np. 17 β -estradiolu) w organizmach ssaków.

Działanie antytyroidowe jest to zdolność substancji chemicznej do hamowania działania naturalnego hormonu tarczycy (np. T₃) w organizmach ssaków.

Dawkowanie jest to określenie ogólne obejmujące wysokość dawki, częstotliwość jej podawania i czas trwania podawania substancji.

Dawka jest to ilość podawanej badanej substancji chemicznej. Dawkę wyraża się jako masę badanej substancji chemicznej na jednostkę masy ciała zwierzęcia doświadczalnego na dzień (np. mg/kg masy ciała/dzień) lub jako stałe stężenie w diecie.

Wyraźna toksyczność jest to określenie ogólne opisujące wyraźne oznaki toksyczności występujące po podaniu badanej substancji chemicznej. Powinny one być wystarczające do oceny ryzyka i takie, że można oczekiwać, iż zwiększenie podawanej dawki spowoduje pojawienie się silnych oznak toksyczności i prawdopodobną śmiertelność.

NOAEL jest to skrót oznaczający poziom dawkowania, przy którym nie obserwuje się szkodliwych zmian. Jest to najwyższy poziom dawkowania, przy którym nie obserwuje się szkodliwych efektów związanych z podawaniem substancji na skutek jej podawania.

Działanie estrogenowe jest to zdolność substancji chemicznej do działania przypominającego działanie naturalnego hormonu estrogenowego (np. 17 β -estradiolu) w organizmach ssaków.

Badana substancja chemiczna: jakkolwiek substancja lub mieszanina badana za pomocą niniejszej metody badawczej.

Działanie tyroidowe jest to zdolność substancji chemicznej do działania przypominającego działanie naturalnego hormonu tarczycy (np. T₃) w organizmach ssaków.

Walidacja jest to proces naukowy mający na celu scharakteryzowanie wymogów operacyjnych i ograniczeń metody badawczej i wykazanie jej wiarygodności oraz odpowiedniości do danego celu.

Dodatek 2

Punkty końcowe zalecane do wykrywania substancji zaburzających funkcjonowanie układu hormonalnego w niniejszej metodzie badawczej B.7

| Obowiązkowe punkty końcowe | Opcjonalne punkty końcowe |
|--|---|
| Masa | |
| — Jądra | — Jajniki |
| — Najądrza | — Macica wraz z szyjką |
| — Nadnercza | — Tarczyca |
| — Prostata + pęcherzyki nasienne wraz z gruczołami koagulującymi | |
| Histopatologia | |
| — Gonady: | — Rozmazy śluzówki pochwy |
| — Jądra oraz | — Męskie gruczoły mlekowe |
| — Jajniki | — Przesadka mózgowa |
| — Płciowe narządy dodatkowe: | |
| — Najądrza, | |
| — Prostata + pęcherzyk nasienny wraz z gruczołami koagulującymi | |
| — Macica wraz z szyjką | |
| — Nadnercze | |
| — Tarczyca | |
| — Pochwa | |
| Pomiar poziomu hormonów | |
| | — Poziomy T ₃ i T ₄ we krwi |
| | — Poziomy TSH we krwi |

BIBLIOGRAFIA:

- (1) OECD (Paryż, 1992). Chairman's Report of the Meeting of the ad hoc Working Group of Experts on Systemic Short-term and (Delayed) Neurotoxicity.
- (2) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document nr 60.
- (3) Tupper DE, Wallace RB (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. *Acta Neurobiol. Exp.* 40: 999–1003.
- (4) Gad SC (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. *J. Toxicol Environ. Health* 9: 691–704.
- (5) Moser VC, McDaniel KM, Phillips PM (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 108: 267–283.
- (6) Meyer OA, Tilson HA, Byrd WC, Riley MT (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hindlimb Grip Strength of Rats and Mice. *Neurobehav. Toxicol.* 1: 233–236.
- (7) Crofton KM, Howard JL, Moser VC, Gill MW, Reiter LW, Tilson HA, MacPhail RC (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. *Neurotoxicol. Teratol.* 13: 599–609.
- (8) OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10th-11th March 1998, ENV/MC/CHEM/RA(98)5.
- (9) OECD. (2006). Report of the Validation of the Updated Test Guideline 407: Repeat Dose 28-day Oral Toxicity Study in Laboratory Rats. Series on Testing and Assessment nr 59, ENV/JM/MONO(2006)26.

- (10) OECD (2002). Detailed Review Paper on the Appraisal of Test Methods for Sex Hormone Disrupting Chemicals. Series on Testing and Assessment nr 21, ENV/JM/MONO(2002)8.
- (11) OECD (2012). Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals. http://www.oecd.org/document/58/0,3343,fr_2649_37407_2348794_1_1_1_37407,00.html
- (12) OECD (2006). Final Summary report of the meeting of the Validation Management Group for mammalian testing. ENV/JM/TG/EDTA/M(2006)2.
- (13) OECD. Draft Summary record of the meeting of the Task Force on Endocrine Disrupters Testing and Assessment. ENV/JM/TG/EDTA/M(2006)3.
- (14) OECD (2000). Guidance document on the recognition, assessment and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation. Series on Testing and Assessment nr 19. ENV/JM/MONO(2000)7.
- (15) Haley P, Perry R, Ennulat D, Frame S, Johnson C, Lapointe J-M, Nyska A, Snyder PW, Walker D, Walter G (2005). STP Position Paper: Best Practice Guideline for the Routine Pathology Evaluation of the Immune System. Toxicol Pathol 33: 404–407.
- (16) Hess RA, Moore BJ (1993). Histological Methods for the Evaluation of the Testis. In: Methods in Reproductive Toxicology, Chapin RE and Heindel JJ (eds). Academic Press: San Diego, CA, ss. 52–85.
- (17) Latendresse JR, Warbritton AR, Jonassen H, Creasy DM.(2002) Fixation of testes and eyes using a modified Davidson's fluid: comparison with Bouin's fluid and conventional Davidson's fluid. Toxicol. Pathol. 30, 524–533.
- (18) OECD (2007). OECD Guideline for Testing of Chemicals N°440: Uterotrophic Bioassay in Rodents: A short-term screening test for oestrogenic properties.
- (19) OECD (2009). Guidance Document 106 on Histologic evaluation of Endocrine and Reproductive Tests in Rodents ENV/JM/Mono(2009)11.

B.8. TOKSYCZNOŚĆ PODOSTRA – NARAŻENIE INHALACYJNE: BADANIE 28-DNIOWE

STRESZCZENIE

Niniejszą zmienioną metodę badawczą B.8 opracowano w celu otrzymania pełnej charakterystyki toksyczności badanej substancji chemicznej wskutek narażenia inhalacyjnego po powtarzonym narażeniu przez ograniczony okres (28 dni) oraz uzyskania danych na potrzeby ilościowych ocen ryzyka dotyczącego narażenia inhalacyjnego. Grupy co najmniej 5 samców i 5 samic gryzoni są w ciągu 28 dni przez 6 godzin dziennie narażane na działanie:

a) badanej substancji chemicznej przy co najmniej trzech poziomach stężenia; b) powietrza filtrowanego (ujemna grupa kontrolna); lub c) nośnika (grupa kontrolna nośnika). Na ogół zwierzęta narażane są na działanie substancji przez

5 dni w tygodniu, ale narażenie przez 7 dni w tygodniu również jest dozwolone. Zawsze bada się samce i samice, lecz jeśli wiadomo, że jedna płć jest bardziej podatna na daną badaną substancję chemiczną, zwierzęta różnych płci mogą być poddane narażeniu przy różnych poziomach stężenia. Metoda ta pozwala kierownikowi badania na elastyczność, jeżeli chodzi o włączenie do badania grup satelitarnych (badania odwracalności), płukania oskrzelowo-pęcherzykowego, testów neurologicznych oraz dodatkowych badań z zakresu patologii klinicznej i histopatologicznych w celu lepszego scharakteryzowania toksyczności badanej substancji chemicznej.

WPROWADZENIE

1. Niniejsza metoda badawcza jest równoważna metodzie opisanej w dotyczącej badań wytycznej OECD nr 412 (OECD TG 412) (2009). Pierwotną dotyczącą badań podostrej toksyczności inhalacyjnej wytyczną nr 412 (TG 412) przyjęto w 1981 r. (1). Niniejsza metoda badawcza B.8 (równoważna zmienionej wytycznej TG 412) została zaktualizowana w celu odzwierciedlenia stanu wiedzy naukowej oraz zaspokojenia obecnych i przyszłych potrzeb regulacyjnych.
2. Niniejsza metoda umożliwia scharakteryzowanie szkodliwych zmian w następstwie powtarzanego codziennego narażenia inhalacyjnego na działanie badanej substancji chemicznej przez 28 dni. Dane pochodzące z 28-dniowych badań podostrej toksyczności inhalacyjnej mogą być wykorzystywane do ilościowych ocen ryzyka [o ile nie zostanie następnie przeprowadzone 90-dniowe badanie toksyczności podprzewlekłej wskutek narażenia inhalacyjnego (rozdział B.29 niniejszego załącznika)]. Z danych tych można również uzyskać informacje dotyczące doboru stężeń do badań dłuższych, takich jak 90-dniowe badanie podprzewlekłej toksyczności inhalacyjnej. Niniejsza metoda badawcza nie jest przeznaczona do badania nanomateriałów. Definicje stosowane w kontekście niniejszej metody badawczej znajdują się na końcu tego rozdziału i w wytycznych (GD) nr 39 (2).

WSTĘPNE ROZWAŻANIA

3. Przed przeprowadzeniem badania laboratorium badawcze powinno wziąć pod uwagę wszystkie dostępne informacje na temat badanej substancji chemicznej w celu poprawienia jakości badania oraz zminimalizowania wykorzystania zwierząt. Informacje, które będą pomocne w wyborze odpowiednich badanych stężeń, mogą obejmować nazwę chemiczną, strukturę chemiczną i właściwości fizykochemiczne badanej substancji chemicznej; wyniki wszelkich badań toksyczności *in vitro* lub *in vivo*; przewidywane zastosowania i potencjalne narażenie ludzi; dostępne dane dotyczące (Q)SAR i dane toksykologiczne dotyczące strukturalnie powiązanych związków oraz dane pochodzące z badań ostrej toksyczności inhalacyjnej. Jeżeli w trakcie badania oczekiwana lub obserwowana jest neurotoksyczność, kierownik badania może zdecydować o włączeniu do badania odpowiednich ocen, takich jak zestaw badań czynnościowych i obserwacyjnych i pomiar aktywności motorycznej. Mimo że w przypadku określonych badań decydujące znaczenie może mieć termin narażenia na działanie substancji, przeprowadzanie tych dodatkowych czynności nie powinno kolidować z podstawowym projektem badania.
4. Rozcieńczenia badanych substancji chemicznych mających działanie żrące lub drażniące można badać przy stężeniach, które dadzą pożądany stopień toksyczności [zob. GD 39 (2)]. Podczas narażania zwierząt na działanie tych substancji stężenia docelowe powinny być na tyle niskie, aby nie powodować silnego bólu i stresu, a zarazem wystarczające do przedłużenia krzywej stężenie-odpowiedź do poziomów, które pozwalają osiągnąć regulacyjny i naukowy cel badania. Stężenia te należy wybierać indywidualnie dla każdego przypadku, najlepiej w oparciu o odpowiednio zaprojektowane badanie ustalające zakres, które dostarcza informacji na temat krytycznego punktu końcowego, wszelkich progów powodujących działanie drażniące oraz czasu pojawienia się objawów (zob. pkt 11–13). Należy podać uzasadnienie wyboru stężenia.
5. Zwierzęta w stanie agonalnym oraz zwierzęta wykazujące oczywiste oznaki bólu czy objawy ostrego i przewlekłego stresu powinny zostać uśmiercone w sposób humanitarny. Zwierzęta w stanie agonalnym traktuje się tak samo jak zwierzęta padłe w trakcie badania. Kryteria podejmowania decyzji co do uśmiercenia zwierząt w stanie agonalnym lub cierpiących silny ból oraz wytyczne dotyczące rozpoznawania prognozowanego lub nieuchronnie zbliżającego się zgonu są zawarte w wytycznych OECD dotyczących humanitarnego punktu końcowego (3).

OPIS METODY

Wybór gatunku zwierząt

6. Należy wykorzystać powszechnie stosowane laboratoryjne szczepy zdrowych, młodych, dorosłych gryzoni. Preferowanym gatunkiem jest szczur. Jeżeli wykorzystuje się inny gatunek, należy podać uzasadnienie.

Przygotowanie zwierząt

7. Samice powinny być nieródkami i nie mogą być w ciąży. W dniu randomizacji zwierzęta powinny być młodymi dorosłymi osobnikami w wieku od 7 do 9 tygodni. Masa ciała powinna mieścić się w granicach $\pm 20\%$ średniej masa dla każdej płci. Zwierzęta są wybierane losowo, oznaczane w sposób umożliwiający identyfikację poszczególnych osobników i przetrzymywane w klatkach przynajmniej przez 5 dni przed rozpoczęciem badania, żeby umożliwić aklimatyzację do warunków laboratoryjnych.

Hodowla zwierząt

8. W celu ułatwienia obserwacji i uniknięcia pomyłek zwierzęta powinny być indywidualnie oznakowane przy pomocy, o ile to możliwe, podskórnych transponderów. Temperatura w pomieszczeniach, w których przetrzymuje się zwierzęta doświadczalne, powinna wynosić 22 ± 3 °C. Najlepiej byłoby, gdyby wilgotność względna była utrzymywana w przedziale 30–70 %, chociaż może to być niemożliwe w przypadku stosowania wody jako nośnika. Przed narażeniem i po nim zwierzęta na ogół należy trzymać w klatkach w grupach podzielonych według płci i badanego stężenia, lecz liczba zwierząt w klatce nie powinna przeszkadzać w dokładnej obserwacji każdego zwierzęcia, a także powinna umożliwiać zminimalizowanie strat w zwierzętach spowodowanych kanibalizmem i walkami. Jeżeli zwierzęta mają być poddane narażeniu tylko przez nos, konieczne może być przyzwyczajenie ich do rur unieruchamiających. Rury unieruchamiające nie powinny powodować u zwierząt nadmiernego stresu fizycznego, termicznego czy związanego z unieruchomieniem. Unieruchomienie może wpłynąć na fizjologiczne punkty końcowe, takie jak temperatura ciała (hipertermia) lub minutowa pojemność oddechowa. Jeżeli dostępne są dane ogólne, na podstawie których można wykazać, że takie zmiany nie występują w znaczącym stopniu, uprzednia adaptacja do rur unieruchamiających nie jest konieczna. Zwierzęta, których cała powierzchnia ciała jest narażana na działanie aerozolu, w trakcie narażenia powinny być trzymane oddzielnie, aby zapobiec filtrowaniu badanego aerozolu przez futro innych zwierząt w tej samej klatce. Można stosować konwencjonalne oraz certyfikowane pasze laboratoryjne, z wyjątkiem okresów poddawania narażeniu, należy także zapewnić nieograniczony dostęp do wody pitnej z miejscowej instalacji wodociągowej. Oświetlenie powinno być sztuczne, w cyklu 12 godzin światła, 12 godzin ciemności.

Komory inhalacyjne

9. Przy wyborze komory inhalacyjnej należy wziąć pod uwagę charakter badanej substancji chemicznej i przedmiot badania. Preferowaną drogą narażenia jest narażenie tylko przez nos (pojęcie to obejmuje narażenie tylko głowy, narażenie tylko przez nos lub narażenie tylko pyska). Narażenie tylko przez nos jest na ogół preferowane w badaniach aerozoli ciekłych lub stałych oraz par, które mogą skraplać się, tworząc aerozole. Narażenie całego ciała może lepiej sprzyjać osiągnięciu szczególnych celów badania, taki wybór należy jednak uzasadnić w sprawozdaniu z badania. Aby zagwarantować stabilność atmosfery przy zastosowaniu komory do poddawania narażeniu całego ciała, całkowita »objętość« badanych zwierząt nie powinna przekraczać 5 % objętości komory. Zasady technik narażenia tylko przez nos i przez powierzchnię całego ciała oraz ich szczególne zalety i wady omówiono w GD 39 (2).

BADANIA TOKSYCZNOŚCI**Stężenia graniczne**

10. W przeciwieństwie do badań toksyczności ostrej w 28-dniowych badaniach podostrej toksyczności inhalacyjnej nie ma określonych stężeń granicznych. Przy wyborze maksymalnego badanego stężenia należy uwzględnić: 1) maksymalne stężenie możliwe do uzyskania; 2) poziom narażenia ludzi w najgorszym przypadku; 3) konieczność utrzymania wystarczającej podaży tlenu; lub 4) troskę o dobrostan zwierząt. W przypadku braku wartości granicznych opartych na danych można stosować granice toksyczności ostrej określone w rozporządzeniu (WE) nr 1272/2008 (13) (tj. do maksymalnego stężenia 5 mg/l dla aerozoli, 20 mg/l dla par i 20 000 ppm dla gazów); zob. GD 39 (2). Jeżeli podczas badania gazów lub wysoce lotnych badanych substancji chemicznych (np. czynników chłodniczych) konieczne jest przekroczenie tych granic, należy podać uzasadnienie. Stężenie graniczne powinno wywoływać wyraźną toksyczność bez powodowania zbędnego stresu dla zwierząt ani wpływania na długość ich życia (3).

Badanie ustalające zakres

11. Przed rozpoczęciem badania głównego może być konieczne przeprowadzenie badania ustalającego zakres. Badanie ustalające zakres jest bardziej rozległe niż badanie rozpoznawcze, ponieważ nie jest ograniczone do wyboru stężenia. Wiedza zdobyta poprzez badanie ustalające zakres może doprowadzić do powodzenia badania głównego. Badanie ustalające zakres może na przykład dostarczać informacji technicznych na temat metod analitycznych, klasyfikacji cząstek według wielkości, odkrycia mechanizmów toksycznych, danych z zakresu patologii klinicznej i histopatologicznych oraz oszacowań NOAEL i MTC (ang. *maximum tolerable concentration* – maksymalne tolerowane stężenie) w badaniu głównym. Kierownik badania może postanowić wykorzystać badanie ustalające zakres do określenia progu działania drażniącego na drogi oddechowe (np. przy pomocy histopatologii dróg oddechowych, badania czynności płuc lub płukania oskrzelowo-pęcherzykowego), górnego poziomu stężenia, który jest tolerowany bez zbędnego stresu dla zwierząt, oraz parametrów, które najlepiej charakteryzują toksyczność badanej substancji chemicznej.
12. Badanie ustalające zakres może obejmować jeden poziom stężenia lub większą ich liczbę. Na działanie każdego stężenia należy narażać nie więcej niż trzech samców i trzy samice. Badanie ustalające zakres powinno trwać co najmniej 5 dni i zazwyczaj nie więcej niż 14 dni. Uzasadnienie wyboru stężeń na potrzeby badania głównego należy podać w sprawozdaniu z badania. Celem badania głównego jest wykazanie zależności stężenie-odpowiedź w oparciu o przewidywany najczulszy punkt końcowy. Najlepiej byłoby, gdyby najniższe stężenie było stężeniem, przy którym nie obserwuje się szkodliwych zmian, natomiast najwyższe stężenie powinno wywoływać wyraźną toksyczność bez powodowania zbędnego stresu dla zwierząt ani wpływania na długość ich życia (3).
13. Przy wyborze poziomów stężenia na potrzeby badania ustalającego zakres należy wziąć pod uwagę wszystkie dostępne informacje, w tym zależności struktura-aktywność i dane dotyczące podobnych chemikaliów (zob. pkt 3). W ramach badania ustalającego zakres można zweryfikować/obalić punkty końcowe, które uważa się za najczulsze oparte na mechanistycznym modelu punkty, np. inhibicję pseudocholinesterazy przez związki fosforoorganiczne, tworzenie methemoglobiny przez związki toksyczne dla erytrocytów, hormony tarczycy (T₃, T₄) w odniesieniu do związków tyreotoksycznych, białka, LDH lub neutrofile w płukaniu oskrzelowo-pęcherzykowym w odniesieniu do nieszkodliwych słabo rozpuszczalnych cząstek lub aerozoli mających działanie drażniące na płuca.

Badanie główne

14. Główne badanie toksyczności podostrej na ogół obejmuje trzy poziomy stężenia, a także w razie potrzeby równoległe ujemne (poddane działaniu powietrza) grupy kontrolne lub grupy kontrolne nośnika (zob. pkt 17). Jako pomoc w wyborze odpowiednich poziomów narażenia należy wykorzystać wszystkie dostępne dane, w tym wyniki badań toksyczności ogólnoustrojowej, metabolizmu i kinetyki (szczególną uwagę należy zwrócić na unikanie wysokich stężeń, które prowadzą do nasycenia procesów kinetycznych). W skład każdej badanej grupy wchodzi co najmniej 10 gryzoni (5 samców i 5 samic), które są narażane na działanie badanej substancji chemicznej przez 6 godzin dziennie, 5 dni w tygodniu, przez okres 4 tygodni (całkowity czas trwania badania wynosi 28 dni). Zwierzęta mogą być również poddawane narażeniu przez 7 dni w tygodniu (np. podczas badania wziewnych produktów farmaceutycznych). Jeśli wiadomo, że jedna płęć jest bardziej podatna na działanie danej badanej substancji chemicznej, osobniki różnej płci mogą być narażane na działanie tej substancji przy różnych poziomach stężenia, aby zoptymalizować zależność stężenie-odpowiedź zgodnie z pkt 15. Jeśli gatunki gryzoni inne niż szczury poddaje się narażeniu tylko przez nos, maksymalne okresy narażenia można dostosować, by zminimalizować charakterystyczny dla danego gatunku stres. W przypadku stosowania okresu narażenia krótszego niż 6 godzin dziennie lub gdy konieczne jest przeprowadzenie badania długotrwałego narażenia całego ciała (np. przez 22 godziny dziennie), należy przedstawić uzasadnienie [zob. GD 39 (2)]. W okresie narażenia należy zaprzestać podawania zwierzętom paszy, chyba że okres ten przekracza 6 godzin. Podczas całego okresu poddawania narażeniu całego ciała można zapewnić dostęp do wody.
15. Wybrane stężenia docelowe powinny oddziaływać na organy docelowe i wykazywać wyraźną zależność stężenie-odpowiedź:
 - wysokie stężenie powinno prowadzić do skutków toksycznych, ale nie powinno powodować przewlekłych objawów lub śmiertelności, które uniemożliwiłyby miarodajną ocenę,
 - pośrednie stężenia powinny być tak zróżnicowane, aby osiągnąć stopniowanie skutków toksycznych powodowanych przez stężenie najniższe i najwyższe,
 - najniższe stężenie powinno nie dawać żadnych objawów toksyczności bądź dawać niewielkie objawy.

Badanie satelitarne (badanie odwracalności)

16. Badanie satelitarne (badanie odwracalności) może być wykorzystywane do obserwacji odwracalności, trwałości lub opóźnionego wystąpienia toksyczności przez odpowiednio długi okres po poddaniu działaniu substancji, jednak przez nie mniej niż 14 dni. Grupy satelitarne (grupy w badaniu odwracalności) składają się z pięciu samców i pięciu samic poddanych narażeniu równocześnie ze zwierzętami doświadczalnymi w badaniu głównym. Grupy satelitarne (grupy w badaniu odwracalności) powinny być narażone na działanie badanej substancji chemicznej przy najwyższym stężeniu, a w razie potrzeby należy zastosować równoległe grupy kontrolne poddane działaniu powietrza lub grupy kontrolne nośnika (zob. pkt 17).

Zwierzęta z grupy kontrolnej

17. Zwierzęta z równoległej ujemnej grupy kontrolnej (poddanej działaniu powietrza) powinny być traktowane w taki sam sposób jak zwierzęta z grupy badanej, wyjąwszy fakt, że są one narażane na działanie filtrowanego powietrza zamiast badanej substancji chemicznej. W przypadku gdy do ułatwienia wytworzenia atmosfery na potrzeby badania stosowana jest woda lub inna substancja, do badania należy włączyć grupę kontrolną nośnika zamiast ujemnej grupy kontrolnej (poddanej działaniu powietrza). W miarę możliwości wykorzystywanym nośnikiem powinna być woda. Jeżeli w charakterze nośnika używana jest woda, zwierzęta z grupy kontrolnej powinny być narażone na działanie powietrza o takiej samej wilgotności względnej jak grupy narażone na działanie danej substancji. Wybór odpowiedniego nośnika powinien opierać się na właściwie przeprowadzonym badaniu wstępnym lub danych historycznych. Jeżeli toksyczność nośnika nie jest dobrze znana, kierownik badania może postanowić o zastosowaniu zarówno ujemnej grupy kontrolnej (poddanej działaniu powietrza), jak i grupy kontrolnej nośnika, lecz jest to zdecydowanie odradzane. Jeśli dane historyczne wskazują na to, że nośnik jest nietoksyczny, nie ma potrzeby stosowania ujemnej grupy kontrolnej (poddanej działaniu powietrza) i należy jedynie wykorzystać grupę kontrolną nośnika. Jeśli badanie wstępne badanej substancji chemicznej zawartej w nośniku nie wskazuje na toksyczność, wynika z tego, że dany nośnik jest nietoksyczny przy badanym stężeniu i że należy zastosować grupę kontrolną tego nośnika.

WARUNKI NARAŻENIA NA DZIAŁANIE SUBSTANCJI**Stosowanie stężeń**

18. Zwierzęta są poddawane narażeniu na działanie badanej substancji chemicznej w formie gazu, pary, aerozolu lub mieszaniny tych postaci. Stan fizyczny, który ma być przedmiotem badania, zależy od właściwości fizykochemicznych badanej substancji chemicznej, wybranego stężenia lub postaci fizycznej, która najprawdopodobniej będzie występować podczas postępowania z badaną substancją chemiczną i jej stosowania. Badane substancje chemiczne o charakterze higroskopijnym oraz reaktywne chemicznie należy badać w suchej atmosferze. Należy zachować ostrożność, aby uniknąć osiągnięcia stężenia wybuchowego. Cząstki stałe można poddać procesom mechanicznym w celu zmniejszenia wielkości cząstek. Dalsze wytyczne przedstawiono w GD 39 (2).

Rozkład wielkości cząstek

19. W odniesieniu do wszystkich aerozoli oraz par, które mogą skraplać się, tworząc aerozole, należy dokonać klasyfikacji cząstek według wielkości. W celu umożliwienia narażenia wszystkich odpowiednich części dróg oddechowych na działanie danej substancji zalecane są aerozole o średnicy aerodynamicznej mediany rozkładu masowego (MMAD) wynoszącej od 1 do 3 μm przy geometrycznym standardowym odchyleniu (σ_g) równym od 1,5 do 3,0 (4). Należy dołożyć rozsądnych starań, aby spełnić tę normę, jednak w razie niemożności jej osiągnięcia należy przedstawić ocenę eksperta. Na przykład cząstki par metali będą mniejsze od tej normy, a naładowane cząstki i włókna mogą ją przekraczać.

Przygotowanie badanej substancji chemicznej w nośniku

20. Najlepiej byłoby analizować badaną substancję chemiczną bez nośnika. Jeżeli w celu osiągnięcia odpowiedniego stężenia i wielkości cząstek badanej substancji chemicznej konieczne jest stosowanie nośnika, preferowanym nośnikiem powinna być woda. Zawsze kiedy badana substancja chemiczna jest rozpuszczona w nośniku, należy wykazać jej stabilność.

MONITOROWANIE WARUNKÓW NARAŻENIA NA DZIAŁANIE SUBSTANCJI**Przepływ powietrza w komorze**

21. Przepływ powietrza przez komorę inhalacyjną powinien być dokładnie kontrolowany, monitorowany w sposób ciągły i rejestrowany przynajmniej co godzinę podczas każdego narażenia. Monitorowanie w czasie rzeczywistym stężenia (lub jego czasowej stabilności) badanej substancji w atmosferze doświadczalnej jest całościowym pomiarem wszystkich parametrów dynamicznych i stanowi pośredni sposób kontrolowania wszystkich istotnych dynamicznych parametrów inhalacyjnych. Jeśli stężenie jest monitorowane w czasie rzeczywistym, częstotliwość pomiaru przepływu powietrza może być zmniejszona do jednego pomiaru dziennie na narażenie. Szczególną uwagę należy zwrócić na unikanie ponownego wdychania w komorach służących do narażania tylko przez nos. Stężenie tlenu powinno wynosić co najmniej 19 %, a stężenie dwutlenku węgla nie powinno przekraczać 1 %. Jeżeli istnieją powody, by przypuszczać, że normy tej nie można osiągnąć, należy mierzyć stężenia tlenu i dwutlenku węgla. Jeśli w pierwszym dniu narażenia pomiary wykazają, że stężenia tych gazów są odpowiednie, dalsze pomiary nie powinny być konieczne.

Temperatura i wilgotność względna w komorze

22. W komorze należy utrzymywać temperaturę na poziomie 22 ± 3 °C. Wilgotność względna w strefie oddychania zwierząt powinna być stale monitorowana i rejestrowana co godzinę podczas każdego narażenia, jeżeli to możliwe, zarówno w przypadku narażenia tylko przez nos, jak i narażenia całego ciała. Wilgotność względna powinna być utrzymywana w przedziale od 30 do 70 %, lecz może to być albo nieosiągalne (np. przy badaniu mieszanin na bazie wody), albo niemierzalne z powodu interferencji badanej substancji chemicznej z metodą badawczą.

Badana substancja chemiczna: stężenie nominalne

23. Tam, gdzie to możliwe, należy obliczyć i zarejestrować stężenie nominalne w komorze badawczej. Stężenie nominalne jest to masa wytworzonej badanej substancji chemicznej podzielona przez całkowitą objętość powietrza przepuszczonego przez układ komory inhalacyjnej. Stężenie nominalne nie służy do charakteryzowania narażenia zwierząt, lecz porównanie stężenia nominalnego i stężenia rzeczywistego umożliwia określenie w przybliżeniu efektywności wytwarzania w układzie badawczym, a tym samym można je wykorzystać do wykrywania problemów z wytwarzaniem.

Badana substancja chemiczna: stężenie rzeczywiste

24. Stężenie rzeczywiste to stężenie badanej substancji chemicznej w próbkach pobranych w strefie oddychania zwierząt w komorze inhalacyjnej. Stężenie rzeczywiste można obliczyć za pomocą metod specyficznych (np. bezpośredniego pobierania próbek, metod adsorpcji lub reakcji chemicznej, a następnie charakterystyki analitycznej) lub metod niespecyficznych, takich jak analiza grawimetryczna przy zastosowaniu filtra. Zastosowanie metody grawimetrycznej jest akceptowalne tylko w przypadku aerozoli proszkowych zawierających jeden składnik lub aerozoli cieczy o niskiej lotności i należy wtedy przed badaniem wykonać odpowiednią, specyficzną dla badanej substancji chemicznej charakterystykę. Za pomocą metody grawimetrycznej można również określić stężenie wieloskładnikowego aerozolu proszkowego. Do tego jednak konieczne są dane analityczne, za pomocą których można wykazać, że skład materiału znajdującego się w powietrzu jest podobny do składu materiału wyjściowego. W razie braku takich informacji może być konieczna ponowna analiza badanej substancji chemicznej (najlepiej znajdującej się w powietrzu) w toku badania, w regularnych odstępach czasowych. W przypadku środków w formie aerozoli, które mogą ulec odparowaniu lub sublimacji, należy wykazać, że stosując wybraną metodę, zebrano wszystkie fazy.
25. O ile to możliwe, przez cały czas trwania badania należy używać jednej partii badanej substancji chemicznej, a badana próbka powinna być przechowywana w warunkach zapewniających zachowanie jej czystości, jednorodności i stabilności. Przed rozpoczęciem badania należy scharakteryzować badaną substancję chemiczną, w tym określić jej czystość oraz, o ile jest to wykonalne z technicznego punktu widzenia, tożsamość oraz ilości zidentyfikowanych domieszek i zanieczyszczeń. Można to przedstawić między innymi za pomocą następujących danych: czasu retencji i względnej powierzchni sygnału, masy cząsteczkowej uzyskanej w drodze spektrometrii masowej lub chromatografii gazowej bądź innych oszacowań. Mimo że tożsamość badanej próbki nie należy do obowiązków laboratorium badawczego, rozsądne może być potwierdzenie przez to laboratorium charakterystyki, którą przedstawił sponsor, przynajmniej w ograniczonym zakresie (np. koloru, cech fizycznych itp.).
26. Podczas narażenia należy utrzymywać możliwie niezmienną atmosferę doświadczalną. W celu wykazania stabilności warunków narażenia można wykorzystać urządzenie umożliwiające monitorowanie w czasie rzeczywistym, takie jak fotometr w przypadku aerozoli lub analizator węglowodorów całkowitych w przypadku par. Stężenie rzeczywiste w komorze powinno być mierzone co najmniej 3 razy w ciągu każdego dnia narażenia dla każdego poziomu narażenia. Jeśli nie jest to możliwe ze względu na ograniczone natężenie przepływu powietrza lub niskie stężenie, dopuszczalne jest pobieranie jednej próbki na okres narażenia. Najlepiej byłoby, gdyby w takim przypadku próbka była pobierana przez cały okres narażenia. Poszczególne próbki stężenia w komorze nie powinny odbiegać od średniego stężenia w komorze o więcej niż $\pm 10\%$ dla gazów i par oraz o więcej niż $\pm 20\%$ dla aerozoli ciekłych lub stałych. Należy obliczyć i podać okres wyrównania stężeń w komorze (t_{95}). Czas trwania narażenia obejmuje czas wprowadzania badanej substancji chemicznej do komory. Uwzględnia się w tym okres wyrównania stężeń w komorze (t_{95}) i czas rozpadu. Wytyczne dotyczące szacowania t_{95} można znaleźć w GD 39 (2).
27. W przypadku bardzo złożonych mieszanin składających się z gazów/par i aerozoli (np. w przypadku atmosfery spalania i badanych substancji chemicznych wydzielenych ze specjalnych produktów/urządzeń do zastosowania końcowego) każda faza może zachowywać się inaczej w komorze inhalacyjnej. W związku z tym należy wybrać co najmniej jedną substancję wskaźnikową (analit) dla każdej fazy (gaz/pary i aerozol), zwykle główną substancję czynną w mieszaninie. Jeżeli badana substancja chemiczna jest mieszaniną, należy podać stężenie analityczne w odniesieniu do całej mieszaniny, a nie tylko składnika aktywnego lub substancji wskaźnikowej (analitu). Dodatkowe informacje na temat stężeń rzeczywistych można znaleźć w GD 39 (2).

Badana substancja chemiczna: rozkład wielkości cząstek

28. Rozkład wielkości cząstek aerozoli należy określać co najmniej raz w tygodniu w odniesieniu do każdego poziomu stężenia za pomocą impaktora kaskadowego lub innego instrumentu, takiego jak aerodynamiczny spektrometr pomiaru cząstek. Jeżeli można wykazać równoważność wyników uzyskanych za pośrednictwem impaktora kaskadowego i innego instrumentu, to ten inny instrument może być stosowany przez cały okres badania.
29. W celu potwierdzenia sprawności zatrzymywania cząstek przez instrument główny należy równoległe do tego instrumentu stosować drugie urządzenie, takie jak filtr grawimetryczny lub odpylacz/bełkotka. Stężenie masowe uzyskane na podstawie analizy wielkości cząstek powinno mieścić się w rozsądnych granicach stężenia masowego uzyskanego poprzez analizę filtrów [zob. GD 39 (2)]. Dalsze pomiary potwierdzające można pominąć, jeśli można wykazać równoważność w odniesieniu do wszystkich stężeń badanych w początkowej fazie badania. Ze względu na dobrostan zwierząt należy podjąć środki mające na celu zminimalizowanie ilości danych niejednoznacznych, które mogą spowodować konieczność powtórzenia badania.
30. Klasyfikację cząstek według wielkości należy przeprowadzić w odniesieniu do par, jeżeli istnieje jakakolwiek możliwość tworzenia się aerozolu wskutek kondensacji par lub jeśli cząstki są wykrywane w atmosferze parowej mającej potencjał tworzenia faz mieszanych.

OBSERWACJE

31. Zwierzęta powinny być poddane obserwacji klinicznej przed okresem narażenia, w jego trakcie i po nim. W zależności od reakcji zwierząt podczas narażenia wskazane może być częstsze dokonywanie obserwacji. Jeżeli obserwacja zwierząt jest utrudniona wskutek zastosowania rur unieruchamiających zwierzęta, słabo oświetlonych komór do narażenia całego ciała lub nieprzejrzystości powietrza, zwierzęta powinny być uważnie obserwowane po narażeniu. W ramach obserwacji przed kolejnym dniem narażenia można ocenić odwracalność lub nasilenie skutków toksycznych.
32. Wszystkie obserwacje są systematycznie zapisywane, przy czym w odniesieniu do każdego zwierzęcia prowadzone są indywidualne rejestry. W przypadku uśmiercenia zwierząt z przyczyn humanitarnych lub stwierdzenia ich zgonu należy możliwie najdokładniej zapisać czas zgonu.
33. Obserwacje zwierząt w klatkach powinny obejmować zmiany skóry i sierści, oczu i błon śluzowych; zmiany w układzie oddechowym i układzie krążenia; zmiany w układzie nerwowym oraz zmiany w aktywności somatycznej i sposobie zachowania się. Należy poświęcić uwagę obserwacjom drżenia, konwulsji, ślinotoku, biegunki, letargu, snu i śpiączki. Pomiar temperatury w odbycie może dostarczyć dodatkowych dowodów potwierdzających odruchowe spowolnienie oddechu lub hipo-/hipertermię w związku z poddawaniem działaniu substancji lub przetrzymywaniem w zamknięciu. W protokole badania można uwzględnić dodatkowe oceny, takie jak dotyczące: kinetyki, biomonitoringu, czynności płuc, zatrzymywania słabo rozpuszczalnych substancji, które gromadzą się w tkance płuc, oraz zmian w zachowaniu.

MASA CIAŁA

34. Masę ciała poszczególnych zwierząt należy odnotować tuż przed pierwszym narażeniem (dzień 0), następnie dwa razy w tygodniu (na przykład w piątki i poniedziałki, aby wykazać zdrowienie przez weekend, kiedy nie dochodzi do narażenia, lub w odstępach czasu pozwalających na ocenę toksyczności ogólnoustrojowej) oraz w chwili zgonu lub eutanazji. Jeżeli w ciągu pierwszych 2 tygodni nie wystąpią żadne skutki, przez pozostały czas badania masę ciała można mierzyć co tydzień. Zwierzęta z grupy satelitarnej (grupy w badaniu odwracalności) (jeżeli są wykorzystywane) należy ważyć co tydzień przez cały okres zdrowienia. Na koniec badania wszystkie zwierzęta należy zważyć tuż przed uśmierceniem, aby umożliwić obiektywne obliczenie stosunku masy poszczególnych organów do masy ciała.

SPOŻYCIE POKARMU I WODY

35. Spożycie pokarmu należy mierzyć raz w tygodniu. Spożycie wody również można mierzyć.

PATOLOGIA KLINICZNA

36. Oceny z zakresu patologii klinicznej należy przeprowadzać dla wszystkich zwierząt, w tym zwierząt z grupy satelitarnej (grupy w badaniu odwracalności), gdy są one uśmiercane. Należy odnotować odstęp czasu pomiędzy zakończeniem narażenia a pobraniem krwi, szczególnie gdy odtworzenie danego punktu końcowego zachodzi szybko. Pobranie próbek po zakończeniu narażenia wskazane jest w przypadku tych parametrów, które charakteryzują się krótkim okresem półtrwania w osoczu (np. COHb, CHE i MetHb).
37. Tabela 1 zawiera wykaz parametrów analizy patologicznej, które są na ogół wymagane we wszystkich badaniach toksykologicznych. Badanie moczu nie jest wymagane jako badanie rutynowe, lecz można je wykonać, gdy zostanie to uznane za przydatne na podstawie spodziewanej lub obserwowanej toksyczności. Kierownik badania może zdecydować o ocenie dodatkowych parametrów, aby lepiej scharakteryzować toksyczność badanej substancji chemicznej (np. pseudocholinesterazy, lipidów, hormonów, równowagi kwasowo-zasadowej, methemoglobiny lub ciałek Heinza, kinazy kreatynowej, stosunku komórek mieloidalnych do erytroidalnych, troponin, gazów krwi tętniczej, dehydrogenazy mleczanowej, dehydrogenazy sorbitolowej, dehydrogenazy glutaminianowej oraz gamma-glutamylotranspeptydazy).

Tabela 1

Standardowe parametry analizy patologicznej

| Hematologia | |
|--|---|
| Liczba czerwonych krwinek | Całkowita liczba leukocytów |
| Hematokryt | Różnicowa liczba leukocytów |
| Stężenie hemoglobiny | Liczba płytek krwi |
| Średnia masa hemoglobiny w krwince czerwonej | Krzepliwość (wybrać jedną opcję): |
| Średnia objętość krwinki czerwonej | — Czas protrombinowy |
| Średnie stężenie hemoglobiny w krwince czerwonej | — Czas krzepnięcia |
| Retikulocyty | — Czas częściowej tromboplastyny po aktywacji |

| Chemia kliniczna | |
|---------------------------------|----------------------------------|
| Głukoza (*) | Aminotransferaza alaninowa |
| Cholesterol całkowity | Aminotransferaza asparaginianowa |
| Trójglicerydy | Fosfataza alkaliczna |
| Azot mocznikowy we krwi | Potas |
| Bilirubina całkowita | Sód |
| Kreatynina | Wapń |
| Białko całkowite | Fosfor |
| Albumina | Chlorek |
| Globulina | |
| Badanie moczu (opcjonalne) | |
| Wygląd (barwa i mętność) | Białko całkowite |
| Objętość | Głukoza |
| Ciężar właściwy lub osmolalność | Krew/komórki krwi |
| pH | |

(*) Ponieważ długi okres wstrzymywania podawania pokarmu może prowadzić do błędów systematycznych w pomiarach glukozy u zwierząt poddawanych działaniu substancji w porównaniu ze zwierzętami z grupy kontrolnej, kierownik badania powinien zdecydować, czy wstrzymanie karmienia zwierząt jest właściwe. Jeżeli stosowane jest wstrzymanie podawania pokarmu, jego okres powinien być odpowiedni dla wykorzystywanych gatunków zwierząt; w przypadku szczura może to być 16 h (niekarmienie przez noc). Oznaczenie glukozy na czczo można przeprowadzić po wstrzymaniu podawania pożywienia przez całą noc w ciągu ostatniego tygodnia narażenia lub po całonocnym niekarmieniu przed sekcją zwłok (w tym ostatnim przypadku wraz z pomiarem wszystkich innych parametrów analizy patologicznej).

38. Jeżeli istnieją dowody na to, że dolne drogi oddechowe (tj. pęcherzyki płucne) są głównym miejscem osadzania się i zatrzymywania danej substancji, preferowaną techniką ilościowej analizy hipotetycznych parametrów efektu dawki związanych z zapaleniem pęcherzyków płucnych, zapaleniem płuc i fosfolipidozą może być płukanie oskrzelowo-pęcherzykowe. Umożliwia to właściwe zbadanie zależności dawka-odpowiedź i zmian uszkodzeń pęcherzyków płucnych w funkcji czasu. Popłuczyny oskrzelowo-pęcherzykowe można badać pod kątem całkowitej i różnicowej liczby leukocytów, białka całkowitego oraz dehydrogenazy mleczanowej. Innymi parametrami, które można wziąć pod uwagę, są te, które wskazują na uszkodzenia lizosomów, fosfolipidozę, zwłóknienie oraz stan zapalny wskutek podrażnienia lub stan alergiczny, który może wymagać oznaczenia cytokin/chemokin prozapalnych. Pomiar popłuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych na ogół uzupełniają wyniki badań histopatologicznych, lecz nie mogą ich zastępować. Wytyczne dotyczące przeprowadzania płukania oskrzelowo-pęcherzykowego można znaleźć w GD 39 (2).

WYRAŻNE ZMIANY PATOLOGICZNE I MASA ORGANÓW

39. Wszystkie badane zwierzęta, w tym te, które padły podczas badania lub zostały wyeliminowane z badania ze względu na ich dobrostan, powinny zostać poddane całkowitemu wykrwawieniu (jeżeli to możliwe) i pełnemu rozpoznaniu histopatologicznemu. Należy odnotować czas pomiędzy zakończeniem ostatniego narażenia każdego zwierzęcia a jego uśmierceniem. Jeżeli sekcji zwłok nie można przeprowadzić natychmiast po znalezieniu martwego zwierzęcia, zwierzę należy schłodzić (nie zamrozić) do temperatury wystarczająco niskiej do zminimalizowania autolizy. Sekcję zwłok należy przeprowadzić możliwie szybko, zwykle w ciągu jednego lub dwóch dni. W odniesieniu do każdego zwierzęcia należy odnotować wszystkie makroskopowe zmiany patologiczne ze szczególnym uwzględnieniem wszelkich zmian w drogach oddechowych.
40. Tabela 2 zawiera wykaz organów i tkanek, które należy zachować w odpowiednim środku w trakcie pełnego rozpoznania histopatologicznego na potrzeby badania histopatologicznego. Organy i tkanki [wymienione w nawiasach kwadratowych] oraz wszelkie inne organy i tkanki można zachować według uznania kierownika badania. Organy wymienione **czcionką pogrubioną** należy okroić i zważyć w stanie wilgotnym niezwłocznie po przeprowadzeniu sekcji w celu uniknięcia wyschnięcia. Tarczycę i najądrza należy zważyć wyłącznie wówczas, gdy jest to konieczne, ponieważ okrajanie artefaktów może utrudnić ocenę histopatologiczną. Tkanki i organy należy utrwalić w 10 % roztworze buforowanej formaliny lub innej odpowiedniej substancji utrwalającej niezwłocznie po przeprowadzeniu sekcji zwłok i nie później niż na 24–48 godzin przed okrojeniem, w zależności od stosowanej substancji utrwalającej.

Tabela 2

Organy i tkanki zachowywane w trakcie pełnego rozpoznania histopatologicznego

| | |
|---|---|
| Nadnercza | Pęcherzyki nasienne |
| Szpik kostny (lub świeży aspirat) | Rdzeń kręgowy (odcinek szyjny, śródpiersiowy i lędźwiowy) |
| Mózg (w tym wycinki kresomózgowia, mózdzku i rdzenia/mostu) | Śledziona |
| [Oczy (siatkówka, nerw wzrokowy) i powieki] | Żołądek |
| Serce | Jądra |
| Nerki | Grasica |
| Krtań (3 poziomy, w tym 1 zawierający podstawę nagłośni) | Tarczycza |
| Wątroba | Tchawica (co najmniej 2 wycinki, w tym 1 wycinek pobrany podłużnie poprzez ostrogę i 1 wycinek pobrany poprzecznie) |
| Płuco (wszystkie płaty na jednym poziomie, w tym oskrzela główne) | [Pęcherz moczowy] |
| Węzły chłonne z okolicy wnęki płuca, szczególnie w przypadku badań słabo rozpuszczalnych badanych substancji chemicznych mających postać cząstek stałych. Na potrzeby bardziej pogłębionych badań lub badań immunologicznych można wziąć pod uwagę dodatkowe węzły chłonne, np. z części śródpiersiowej, szyjnej/podżuchwowej lub usznej. | Macica |
| Tkanki nosogardła (co najmniej 4 poziomy; 1 poziom ma obejmować przewód nosowo-gardłowy i tkankę limfatyczną związaną ze śluzówką nosa (NALT)) | Wszystkie makroskopowe zmiany patologiczne |
| Przełyk | |
| [Opuszka węchowa] | |
| Jajniki | |

41. Płuca należy usunąć w stanie nienaruszonym, zważyć i zaaplikować odpowiednią substancję utrwalającą pod ciśnieniem 20–30 cm wody celem zapewnienia utrzymania ich struktury (5). Wycinki należy pobrać dla wszystkich płatów na jednym poziomie, w tym z oskrzeli głównych, lecz w przypadku przeprowadzania płukania oskrzelowo-pęcherzykowego z nieprzepłukanego płatu należy pobrać wycinki na trzech poziomach (nie szeregowo).
42. Należy zbadać co najmniej 4 poziomy tkanek nosogardła, z których jeden powinien obejmować przewód nosowo-gardłowy (5, 6, 7, 8, 9), aby umożliwić odpowiednie zbadanie nabłonka płaskiego, przejściowego (oddechowego nieurzęsionego), oddechowego (oddechowego urzęsionego) i węchowego, a także tkanki limfatycznej związanej ze śluzówką nosa (NALT; 10, 11). Należy zbadać trzy poziomy krtani, a jeden z tych poziomów powinien obejmować podstawę nagłośni (12). Należy zbadać co najmniej dwa poziomy tchawicy, w tym pobrać jeden wycinek pobrany podłużnie przez ostrogę rozgałęzienia oskrzeli pozapłucnych i jeden wycinek pobrany poprzecznie.

HISTOPATOLOGIA

43. Ocena histopatologiczną wszystkich organów i tkanek wymienionych w tabeli 2 należy przeprowadzić w odniesieniu do grupy kontrolnej i grupy otrzymującej wysokie stężenie substancji, a także wszystkich zwierząt, które padły lub zostały uśmiercone podczas badania. Szczególną uwagę należy zwrócić na drogi oddechowe, organy docelowe i makroskopowe zmiany patologiczne. Organy i tkanki zwierząt z grupy otrzymującej wysokie stężenie substancji, w których stwierdzono zmiany patologiczne, należy zbadać we wszystkich grupach. Kierownik badania może zdecydować o przeprowadzeniu ocen histopatologicznych dla dodatkowych grup, aby wykazać wyraźną zależność stężenie-odpowiedź. Jeśli używa się grupy satelitarnej (grupy w badaniu odwracalności), należy przeprowadzić ocenę histopatologiczną wszystkich tkanek i organów, w których stwierdzono skutki podania substancji w grupach otrzymujących substancję badaną. W przypadku występowania nadmiernej liczby wczesnych zgonów lub innych problemów w grupie poddawanej wysokiemu narażeniu, które negatywnie wpływają na istotność danych, badania histopatologiczne należy przeprowadzić w grupie otrzymującej daną substancję o kolejnym, niższym stężeniu. Należy podjąć próbę skorelowania wyników całości obserwacji z wynikami badań mikroskopowych.

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ**Dane**

44. W odniesieniu do każdego zwierzęcia należy przedstawić dane dotyczące masy ciała, spożycia pokarmu, patologii klinicznej, wyraźnych zmian patologicznych, masy organów i histopatologii. Dane z obserwacji klinicznych należy zestawić w postaci tabeli, przedstawiając w odniesieniu do każdej badanej grupy liczbę wykorzystanych zwierząt, liczbę zwierząt wykazujących specyficzne objawy toksyczności, liczbę zwierząt padłych w trakcie trwania badania lub uśmierconych z przyczyn humanitarnych, czasu zgonu poszczególnych zwierząt, opis skutków toksycznych oraz ich przebieg w czasie i odwracalność, a także wyniki sekcji zwłok. Wszystkie wyniki ilościowe i dodatkowe należy ocenić za pomocą właściwej metody statystycznej. Można zastosować dowolną ogólnie przyjętą metodę statystyczną, przy czym wyboru metod statystycznych należy dokonać podczas przygotowywania projektu badania.

Sprawozdanie z badania

45. Sprawozdanie z badania powinno w stosownych przypadkach zawierać następujące informacje:

Badane zwierzęta i ich hodowla

- opis warunków przetrzymywania w klatkach, w tym: liczba (lub zmiana liczby) zwierząt na klatkę, ściółka, temperatura otoczenia i wilgotność względna, fotoperiod i określenie diety,
- wykorzystany gatunek/szczep oraz uzasadnienie zastosowania gatunków innych niż szczur. Można przedstawić źródło i dane historyczne, jeżeli dotyczą one zwierząt poddanych podobnemu narażeniu oraz warunkom przebywania i żywieniowym,
- liczba, wiek i płeć zwierząt,
- metoda randomizacji,
- opis wszelkich przygotowań przed badaniem, w tym diety, kwarantanny i leczenia chorób.

Badana substancja chemiczna

- cechy fizyczne, czystość oraz w stosownych przypadkach właściwości fizykochemiczne (w tym izomeryzacja),
- dane identyfikacyjne i numer w rejestrze Chemical Abstract Services (CAS), jeżeli jest znany.

Nośnik

- uzasadnienie zastosowania nośnika oraz uzasadnienie wyboru nośnika (jeżeli jest inny niż woda),
- dane historyczne lub równoległe wykazujące, że nośnik nie zakłóca wyniku badania.

Komora inhalacyjna

- szczegółowy opis komory inhalacyjnej, w tym jej rozmiary i schemat,
- źródło i opis wyposażenia wykorzystywanego do celów narażenia zwierząt, jak również do wytwarzania atmosfery,
- wyposażenie do pomiaru temperatury, wilgotności, rozmiaru cząstek i stężenia rzeczywistego,
- źródło powietrza i system klimatyzacji,
- metody kalibracji wyposażenia w celu zapewnienia jednorodnej atmosfery na potrzeby badania,
- różnica ciśnienia (dodatnia lub ujemna),
- porty narażenia w komorze (narażenie tylko przez nos); lokalizacja zwierząt w komorze (narażenie całego ciała),

- stabilność atmosfery doświadczalnej,
- lokalizacja czujników temperatury i wilgotności oraz pobieranie próbek powietrza w komorze,
- oczyszczanie dostarczanego/odprowadzanego powietrza,
- natężenie przepływu powietrza, natężenie przepływu powietrza/port narażenia (narażenie tylko przez nos) lub ładunek zwierząt/komorę (narażenie całego ciała),
- okres wyrównania stężeń w komorze inhalacyjnej (t_{95}),
- liczba zmian objętości na godzinę,
- urządzenia pomiarowe (w stosownych przypadkach).

Dane dotyczące narażenia

- uzasadnienie wyboru docelowego stężenia w badaniu głównym,
- stężenia nominalne (całkowita masa badanej substancji chemicznej wprowadzonej do komory inhalacyjnej podzielona przez ilość powietrza przepuszczonego przez komorę),
- rzeczywiste stężenia badanej substancji chemicznej w próbkach ze strefy oddychania zwierząt; w przypadku mieszanin, które tworzą heterogeniczne formy fizyczne (gazy, pary, aerozole), każdą substancję można analizować oddzielnie,
- wszystkie stężenia substancji w powietrzu należy podawać w jednostkach masy (mg/l, mg/m³ itd.), a nie w jednostkach objętości (ppm, ppb itd.),
- rozkład wielkości cząstek, średnica aerodynamiczna mediany rozkładu masowego (MMAD) oraz geometryczne standardowe odchylenie (σ_g), w tym metody ich obliczania. Należy odnotować poszczególne analizy wielkości cząstek.

Warunki badania

- szczegółowe informacje na temat przygotowania badanej substancji chemicznej, w tym szczegóły dotyczące wszelkich procedur zastosowanych w celu zmniejszenia rozmiaru cząstek ciał stałych lub przygotowania roztworów badanej substancji chemicznej,
- opis (najlepiej wraz ze schematem) wyposażenia wykorzystywanego do wytworzenia atmosfery na potrzeby badania i narażania zwierząt na jej działanie,
- szczegółowe informacje na temat wyposażenia stosowanego do monitorowania temperatury, wilgotności i przepływu powietrza w komorze (tj. opracowanie krzywej kalibracyjnej),
- szczegółowe informacje na temat wyposażenia stosowanego do pobierania próbek na potrzeby określenia stężenia w komorze i rozkładu wielkości cząstek,
- szczegółowe informacje na temat zastosowanej metody analizy chemicznej oraz walidacji metody (w tym wydajność odzysku badanej substancji chemicznej ze środka do pobierania próbek),
- metoda randomizacji przypisywania zwierząt do grupy badanej i grupy kontrolnej,
- szczegółowe informacje na temat jakości pożywienia i wody (włączając w to rodzaj/źródło diety, źródło wody),
- uzasadnienie wyboru badanych stężeń.

Wyniki

- tabelaryczne zestawienie temperatury, wilgotności i przepływu powietrza w komorze,
- tabelaryczne zestawienie danych dotyczących nominalnego i rzeczywistego stężenia w komorze,

- tabelaryczne zestawienie danych dotyczących rozmiaru cząstek, w tym danych dotyczących gromadzenia próbek analitycznych, rozkładu wielkości cząstek oraz obliczenia średnicy aerodynamicznej mediany rozkładu masowego (MMAD) i σ_g ,
- tabelaryczne zestawienie danych dotyczących reakcji i poziomu stężenia dla każdego zwierzęcia (tj. zwierząt wykazujących oznaki toksyczności, w tym śmiertelność, rodzaj, ostrość, czas pojawienia się i czas trwania objawów),
- tabelaryczne zestawienie masy poszczególnych zwierząt,
- tabelaryczne zestawienie spożycia pokarmu,
- tabelaryczne zestawienie danych z zakresu patologii klinicznej,
- wyniki sekcji zwłok oraz badań histopatologicznych w odniesieniu do każdego zwierzęcia, jeżeli są dostępne,
- tabelaryczne zestawienie wszelkich innych mierzonych parametrów.

Omówienie i interpretacja wyników

- szczególny nacisk należy położyć na opis metod zastosowanych w celu spełnienia kryteriów niniejszej metody badawczej, np. dotyczących stężenia granicznego lub rozmiaru cząstek,
- należy uwzględnić respirabilność cząstek w świetle wyników ogólnych, szczególnie jeżeli nie można było spełnić kryterium rozmiaru cząstek,
- w ogólnej ocenie badania należy uwzględnić spójność metod zastosowanych w celu określenia nominalnego i rzeczywistego stężenia oraz relacji między stężeniem rzeczywistym a nominalnym,
- należy uwzględnić prawdopodobną przyczynę zgonu i dominujący sposób działania (ogólnoustrojowy w porównaniu z miejscowym),
- należy przedstawić wyjaśnienie, jeżeli zaistniała konieczność humanitarnego uśmiercenia zwierząt wykazujących oznaki bólu lub objawy ostrego i przewlekłego stresu, zgodnie z kryteriami zawartymi w wytycznych OECD dotyczących humanitarnego punktu końcowego (3),
- należy określić organy docelowe,
- należy określić NOAEL i LOAEL.

BIBLIOGRAFIA:

- (1) OECD (1981). Subchronic Inhalation Toxicity Testing, pierwotna wersja dotyczącej badań wytycznej OECD nr 412, Dyrekcja ds. Środowiska, OECD, Paryż.
- (2) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment nr 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paryż.
- (3) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment nr 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paryż.
- (4) Whalan JE and Redden JC (1994). Interim Policy for Particle Size and Limit Concentration Issues in Inhalation Toxicity Studies. Biuro ds. Programów Stosowania Pestycydów, Agencja Ochrony Środowiska Stanów Zjednoczonych.
- (5) Dungworth DL, Tyler WS, Plopper CE (1985). Morphological Methods for Gross and Microscopic Pathology (rozdział 9) w: Toxicology of Inhaled Material, Witschi, H.P. i Brain, J.D. (red.), Springer Verlag Heidelberg, s. 229–258.
- (6) Young JT (1981). Histopathological examination of the rat nasal cavity. *Fundam. Appl. Toxicol.* 1: 309–312.
- (7) Harkema JR (1990). Comparative pathology of the nasal mucosa in laboratory animals exposed to inhaled irritants. *Environ. Health Perspect.* 85: 231–238.

-
- (8) Woutersen RA, Garderen-Hoetmer A, van Slootweg PJ, Feron VJ (1994). Upper respiratory tract carcinogenesis in experimental animals and in humans. W: Waalkes MP i Ward JM (eds) Carcinogenesis. Target Organ Toxicology Series, Raven Press, Nowy Jork, 215–263.
 - (9) Mery S, Gross EA, Joyner DR, Godo M, Morgan KT (1994). Nasal diagrams: A tool for recording the distribution of nasal lesions in rats and mice. *Toxicol. Pathol.* 22: 353–372.
 - (10) Kuper CF, Koornstra PJ, Hameleers DMH, Biewenga J, Spit BJ, Duijvestijn AM, Breda Vriesman van PJC, Sminia T (1992). The role of nasopharyngeal lymphoid tissue. *Immunol. Today* 13: 219–224.
 - (11) Kuper CF, Art. JHE, Feron VJ (2003). Toxicity to nasal-associated lymphoid tissue. *Toxicol. Lett.* 140–141: 281–285.
 - (12) Lewis DJ (1981). Mitotic Indices of Rat Laryngeal Epithelia. *Journal of Anatomy* 132(3): 419–428.
 - (13) Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1272/2008 z dnia 16 grudnia 2008 r. w sprawie klasyfikacji, oznakowania i pakowania substancji i mieszanin, zmieniające i uchylające dyrektywy 67/548/EWG i 1999/45/WE oraz zmieniające rozporządzenie (WE) nr 1907/2006 (Dz.U. L 353 z 31.12.2008, s. 1).
-

Dodatek 1

DEFINICJA

Badana substancja chemiczna: jakakolwiek substancja lub mieszanina badana za pomocą niniejszej metody badawczej.;"

5) rozdziały B.29 i B.30 otrzymują brzmienie:

„B.29. TOKSYCZNOŚĆ PODPRZEWLEKŁA – NARAŻENIE INHALACYJNE: BADANIE 90-DNIOWE

STRESZCZENIE

Niniejszą zmienioną metodę badawczą B.29 opracowano w celu uzyskania pełnej charakterystyki toksyczności badanej substancji chemicznej wskutek narażenia inhalacyjnego przez okres toksyczności podprzewlekłej (90 dni) oraz zapewnienia danych odpornych na potrzeby ilościowych ocen ryzyka związanego z narażeniem inhalacyjnym. Grupy 10 samców i 10 samic gryzoni są przez 6 godzin dziennie w ciągu 90 dni (13 tygodni) narażane na działanie a) badanej substancji chemicznej przy co najmniej trzech poziomach stężenia; b) filtrowanego powietrza (ujemna grupa kontrolna); lub c) nośnika (grupa kontrolna nośnika). Na ogół zwierzęta narażane są na działanie substancji przez 5 dni w tygodniu, ale narażenie przez 7 dni w tygodniu również jest dozwolone. Zawsze bada się samców i samice, lecz jeśli wiadomo, że jedna płć jest bardziej podatna na działanie danej badanej substancji chemicznej, płć mogą być poddane narażeniu przy różnych poziomach stężenia. Metoda ta pozwala kierownikowi badania na elastyczność, jeżeli chodzi o włączenie do badania grup satelitarnych (badania odwracalności), uśmiercanie zwierząt w trakcie trwania doświadczenia, a także wprowadzenie płukania oskrzelowo-pęcherzykowego, testów neurologicznych oraz dodatkowych badań z zakresu patologii klinicznej i histopatologicznych w celu lepszego scharakteryzowania toksyczności badanej substancji chemicznej.

WPROWADZENIE

1. Niniejsza metoda badawcza jest równoważna metodzie opisanej w dotyczącej badań wytycznej OECD nr 413 (OECD TG 413) (2009). Pierwotną dotyczącą badań podprzewlekłej toksyczności inhalacyjnej wytyczną nr 413 (TG 413) przyjęto w 1981 r. (1). Niniejsza metoda badawcza B.29 (równoważna zmienionej wytycznej TG 413 (2009)) została zaktualizowana w celu odzwierciedlenia stanu wiedzy naukowej oraz zaspokojenia obecnych i przyszłych potrzeb regulacyjnych.
2. Badania toksyczności podprzewlekłej wskutek narażenia inhalacyjnego są wykorzystywane przede wszystkim w celu określenia stężeń regulacyjnych na potrzeby oceny ryzyka pracowników w miejscu pracy. Stosuje się je także do oceny ryzyka dla ludzi związanego z zamieszkaniami i transportem oraz środowiskiem. Niniejsza metoda umożliwiła scharakteryzowanie szkodliwych zmian w następstwie powtarzanego codziennego narażenia inhalacyjnego na badaną substancję chemiczną przez 90 dni (około 10 % długości życia szczura). Dane pochodzące z badań toksyczności podprzewlekłej wskutek narażenia inhalacyjnego mogą być wykorzystywane do ilościowych ocen ryzyka oraz do wyboru stężeń na potrzeby badań toksyczności przewlekłej. Niniejsza metoda badawcza nie jest przeznaczona do badania nanomateriałów. Definicje stosowane w kontekście niniejszej metody badawczej znajdują się na końcu tego rozdziału i w wytycznych (GD) nr 39 (2).

ZAŁOŻENIA WSTĘPNE

3. Przed przeprowadzeniem badania laboratorium badawcze powinno wziąć pod uwagę wszystkie dostępne informacje na temat badanej substancji chemicznej w celu poprawienia jakości badania oraz aby zminimalizować wykorzystanie zwierząt. Informacje, które będą pomocne w wyborze odpowiednich badanych stężeń, mogą obejmować nazwę chemiczną, strukturę chemiczną i właściwości fizykochemiczne badanej substancji chemicznej; wyniki wszelkich badań toksyczności *in vitro* lub *in vivo*; przewidywane zastosowania i potencjalne narażenie ludzi; dostępne dane dotyczące (Q)SAR i dane toksykologiczne dotyczące strukturalnie powiązanych związków oraz dane pochodzące z innych badań narażenia powtarzanego. Jeżeli w trakcie badania oczekiwana lub obserwowana jest neurotoksyczność, kierownik badania może postanowić o włączeniu do badania odpowiednich ocen, takich jak zestaw badań czynnościowych i obserwacyjnych i pomiar aktywności motorycznej. Chociaż w przypadku określonych badań decydujące znaczenie może mieć moment narażenia na działanie substancji, przeprowadzanie tych dodatkowych czynności nie powinno kolidować z podstawowym projektem badania.
4. Rozcieńczenia badanych substancji chemicznych mających działanie żrące lub drażniące można badać przy stężeniach, które dadzą pożądany stopień toksyczności. Dalsze informacje można znaleźć w GD 39 (2). Podczas narażania zwierząt na działanie tych substancji stężenia docelowe powinny być na tyle niskie, aby nie powodować silnego bólu i stresu, a zarazem wystarczające do przedłużenia krzywej stężenie-odpowiedź do poziomów, które pozwalają osiągnąć regulacyjny i naukowy cel badania. Stężenia te należy dobierać indywidualnie dla każdego przypadku, najlepiej w oparciu o odpowiednio zaprojektowane badanie ustalające zakres, które dostarcza informacji na temat krytycznego punktu końcowego, wszelkich progów powodujących działanie drażniące oraz czasu pojawienia się objawów (zob. pkt 11–13). Należy podać uzasadnienie doboru stężenia.
5. Zwierzęta w stanie agonalnym oraz zwierzęta wykazujące oczywiste oznaki bólu czy objawy ostrego i przewlekłego stresu powinny zostać uśmiercone w sposób humanitarny. Zwierzęta w stanie agonalnym traktuje się tak samo jak zwierzęta padłe w trakcie badania. Kryteria podejmowania decyzji co do uśmiercenia zwierząt w stanie agonalnym lub cierpiących silny ból oraz wytyczne dotyczące rozpoznawania prognozowanego lub nieuchronnie zbliżającego się zgonu są zawarte w wytycznych OECD dotyczących humanitarnego punktu końcowego (3).

OPIS METODY

Wybór gatunku zwierząt

6. Należy wykorzystać zdrowe, młode, dorosłe gryzonie pochodzące ze szczepów powszechnie wykorzystywanych w laboratoriach. Preferowanym gatunkiem jest szczur. Jeżeli wykorzystuje się inny gatunek, należy podać uzasadnienie.

Przygotowanie zwierząt

7. Samice powinny być nieródkami i nie mogą być w ciąży. W dniu randomizacji zwierzęta powinny być młodymi dorosłymi osobnikami w wieku od 7 do 9 tygodni. Masa ciała powinna mieścić się w granicach $\pm 20\%$ średniej masy dla każdej płci. Zwierzęta są wybierane losowo, oznaczane w sposób umożliwiający identyfikację poszczególnych osobników i przetrzymywane w klatkach przynajmniej przez 5 dni przed rozpoczęciem badania, żeby umożliwić aklimatyzację do warunków laboratoryjnych.

Hodowla zwierząt

8. W celu ułatwienia obserwacji i uniknięcia pomyłek zwierzęta powinny być indywidualnie oznakowane, najlepiej za pomocą podskórnych transponderów. Temperatura w pomieszczeniach dla zwierząt doświadczalnych powinna wynosić 22 ± 3 °C. Najlepiej byłoby, gdyby wilgotność względna była utrzymywana w przedziale 30–70 %, chociaż może to być niemożliwe w przypadku stosowania wody jako nośnika. Przed narażeniem i po nim zwierzęta na ogół należy trzymać w klatkach w grupach podzielonych według płci i badanego stężenia, lecz liczba zwierząt w klatce nie powinna przeszkadzać w dokładnej obserwacji każdego zwierzęcia, a także powinna umożliwiać zminimalizowanie strat w zwierzętach spowodowanych kanibalizmem i walkami. Jeżeli zwierzęta mają być poddane narażeniu tylko przez nos, konieczne może być ich przyzwyczajenie do rur unieruchamiających. Rury unieruchamiające nie powinny powodować nadmiernego stresu fizycznego i termicznego dla zwierząt ani stresu spowodowanego unieruchomieniem. Unieruchomienie może mieć wpływ na fizjologiczne punkty końcowe, takie jak temperatura ciała (hipertermia) lub minutowa pojemność oddechowca. Jeżeli dostępne są dane ogólne, na podstawie których można wykazać, że takie zmiany nie występują w znaczącym stopniu, uprzednia adaptacja do rur unieruchamiających nie jest konieczna. Zwierzęta, których cała powierzchnia ciała jest narażana na działanie aerozolu, w trakcie narażenia powinny być trzymane oddzielnie, aby zapobiec filtrowaniu badanego aerozolu przez futro innych zwierząt w tej samej klatce. Z wyjątkiem okresu narażenia stosowane mogą być konwencjonalne i certyfikowane pasze laboratoryjne oraz umożliwiony nieograniczony dostęp do wody pitnej z instalacji wodociągowej. Oświetlenie powinno być sztuczne, w cyklu 12 godzin światła, 12 godzin ciemności.

Komory inhalacyjne

9. Przy wyborze komory inhalacyjnej należy wziąć pod uwagę charakter badanej substancji chemicznej i cel badania. Preferowaną drogą narażenia jest narażenie tylko przez nos (pojęcie to obejmuje narażenie tylko przez głowę, nos lub pysk). Metoda narażenia tylko przez nos jest na ogół preferowana w badaniach aerozoli ciekłych lub stałych oraz par, które mogą skraplać się, tworząc aerozole. Narażenie całego ciała może lepiej nadawać się do szczególnych celów badania, ale należy to uzasadnić w sprawozdaniu z badania. Aby zagwarantować stabilność atmosfery przy zastosowaniu komory do poddawania narażeniu całego ciała, łączna objętość badanych zwierząt nie powinna przekraczać 5 % objętości komory. Zasady technik narażenia tylko przez nos i przez powierzchnię całego ciała oraz ich szczególne zalety i wady omówiono w GD 39 (2).

BADANIA TOKSYCZNOŚCI

Stężenia graniczne

10. W przeciwieństwie do badań toksyczności ostrej w badaniach toksyczności podprzewlekłej skutek narażenia inhalacyjnego nie ma określonych stężeń granicznych. Podczas doboru maksymalnego badanego stężenia należy uwzględnić: 1) maksymalne stężenie możliwe do uzyskania; 2) poziom narażenia ludzi w najgorszym przypadku; 3) konieczność utrzymania wystarczającej podaży tlenu; oraz 4) troskę o dobrostan zwierząt. W przypadku braku granic opartych na danych stosowane mogą być granice toksyczności ostrej określone w rozporządzeniu (WE) nr 1272/2008 (13) (tj. do maksymalnego stężenia 5 mg/l dla aerozoli, 20 mg/l dla par i 20 000 ppm dla gazów); zob. GD 39 (2). Jeżeli podczas badania gazów lub wysoce lotnych badanych substancji chemicznych (np. czynników chłodniczych) konieczne jest przekroczenie tych granic, należy podać uzasadnienie. Stężenie graniczne powinno wywoływać wyraźną toksyczność bez powodowania zbędnego stresu dla zwierząt ani wpływania na długość ich życia (3).

Badanie ustalające zakres

11. Przed rozpoczęciem badania głównego na ogół konieczne jest przeprowadzenie badania ustalającego zakres. Badanie ustalające zakres jest bardziej rozległe niż badanie rozpoznawcze, ponieważ nie jest ograniczone do wyboru stężenia. Wiedza zdobyta poprzez badanie ustalające zakres może zadecydować o powodzeniu badania głównego. Badanie ustalające zakres może na przykład dostarczać informacji technicznych na temat metod analitycznych, klasyfikacji cząstek według wielkości, odkrycia mechanizmów toksycznych, danych z zakresu patologii klinicznej i histopatologicznych oraz oszacowań NOAEL i MTC w badaniu głównym. Kierownik badania może postanowić o zastosowaniu badania ustalającego zakres do określenia progu działania drażniącego na drogi oddechowe (np. przy pomocy histopatologii dróg oddechowych, badania czynności płuc lub płukania oskrzelowo-pęcherzykowego), górnego poziomu stężenia, które jest tolerowany bez zbędnego stresu dla zwierząt, oraz parametrów, które najlepiej charakteryzują toksyczność badanej substancji chemicznej.

12. Badanie ustalające zakres może obejmować jeden poziom stężenia lub większą ich liczbę. Na każdym poziomie stężenia należy poddać narażeniu od trzech do sześciu samców i od trzech do sześciu samic – w zależności od wybranych punktów końcowych. Badanie ustalające zakres powinno trwać co najmniej 5 dni i na ogół nie więcej niż 28 dni. Uzasadnienie wyboru stężeń na potrzeby badania głównego należy podać w sprawozdaniu z badania. Celem badania głównego jest wykazanie zależności stężenie-odpowiedź w oparciu o przewidywany najczulszy punkt końcowy. Najlepiej byłoby, gdyby najniższe stężenie było stężeniem, przy którym nie obserwuje się szkodliwych zmian, natomiast najwyższe stężenie powinno wywoływać wyraźną toksyczność bez powodowania zbędnego stresu dla zwierząt ani wpływania na długość ich życia (3).
13. Przy wyborze poziomów stężenia na potrzeby badania ustalającego zakres należy wziąć pod uwagę wszystkie dostępne informacje, w tym zależności struktura-aktywność i dane dotyczące podobnych chemikaliów (zob. pkt 3). W ramach badania ustalającego zakres można zweryfikować/obalić punkty końcowe, które na podstawie modelu mechanistycznego uważa się za najczulsze, np. inhibicję pseudocholinesterazy przez związki fosforoorganiczne, tworzenie methemoglobiny przez związki toksyczne dla erytrocytów, hormony tarczycy (T_3 , T_4) w odniesieniu do związków tyreotoksycznych, białka, LDH lub neutrofile w płukaniu oskrzelowo-pęcherzykowym w odniesieniu do nieszkodliwych słabo rozpuszczalnych cząstek lub aerozoli mających działanie drażniące na płuca.

Badanie główne

14. Główne badanie toksyczności podprzewlekłej na ogół obejmuje trzy poziomy stężenia, a także w razie potrzeby równoległe ujemne (poddane działaniu powietrza) grupy kontrolne lub grupy kontrolne nośnika (zob. pkt 18). Wszystkie dostępne dane, w tym wyniki badań toksyczności ogólnoustrojowej, metabolizmu i kinetyki, powinny być wykorzystane jako pomoc w wyborze odpowiednich poziomów narażenia (szczególną uwagę należy zwrócić na unikanie wysokich stężeń, które prowadzą do nasycenia procesów kinetycznych). W skład każdej badanej grupy wchodzi 10 samców i 10 samic gryzoni, które to zwierzęta są narażane na działanie badanej substancji chemicznej przez 6 godzin dziennie 5 dni w tygodniu przez okres 13 tygodni (całkowity czas trwania badania wynosi co najmniej 90 dni). Zwierzęta mogą być również poddawane narażeniu przez 7 dni w tygodniu (np. podczas badania wziewnych produktów farmaceutycznych). Jeśli wiadomo, że jedna płęć jest bardziej podatna na działanie danej badanej substancji chemicznej, płcie mogą być narażane na działanie tej substancji przy różnych poziomach stężenia, aby zoptymalizować zależność stężenie-odpowiedź zgodnie z pkt 15. Jeśli gatunki gryzoni inne niż szczury poddaje się narażeniu tylko przez nos, maksymalne okresy narażenia można dostosować, by zminimalizować charakterystyczny dla danego gatunku stres. W przypadku stosowania okresu narażenia krótszego niż 6 godzin dziennie lub gdy konieczne jest przeprowadzenie badania długotrwałego narażenia całego ciała (np. przez 22 godziny dziennie), należy przedstawić uzasadnienie (zob. GD 39) (2). W okresie narażenia należy zaprzestać podawania zwierzętom paszy, chyba że okres ten przekracza 6 godzin. W trakcie okresu narażenia całego ciała można podawać zwierzętom wodę.
15. Wybrane stężenia docelowe powinny oddziaływać na organy docelowe i wykazywać wyraźną zależność stężenie-odpowiedź:
- wysokie stężenie powinno prowadzić do skutków toksycznych, ale nie powinno powodować przewlekłych objawów lub śmiertelności, które uniemożliwiłyby miarodajną ocenę,
 - średnie stężenia powinny być zróżnicowane w celu osiągnięcia stopniowania skutków toksycznych powodowanych przez stężenie niskie i wysokie,
 - niskie stężenie nie powinno dawać żadnych objawów toksyczności bądź niewielkie objawy.

Uśmiercanie zwierząt w trakcie trwania doświadczenia

16. Jeżeli planowane jest uśmiercanie zwierząt w trakcie trwania doświadczenia, liczba osobników na każdym poziomie narażenia powinna być powiększona o liczbę zwierząt, którą planuje się uśmiercić przed zakończeniem badania. Należy podać uzasadnienie uśmiercania zwierząt w trakcie trwania doświadczenia oraz należycie uwzględnić te osobniki w analizach statystycznych.

Badanie satelitarne (badanie odwracalności)

17. Badanie satelitarne (badanie odwracalności) może być wykorzystywane do obserwacji odwracalności, trwałości lub opóźnionego wystąpienia toksyczności przez odpowiednio długi okres po poddaniu działaniu substancji, jednak przez nie mniej niż 14 dni. Grupy satelitarne (grupy w badaniu odwracalności) składają się z 10 samców i 10 samic poddanych narażeniu równocześnie ze zwierzętami doświadczalnymi w badaniu głównym. Grupy satelitarne (grupy w badaniu odwracalności) powinny być narażone na działanie badanej substancji chemicznej przy najwyższym stężeniu, a w razie potrzeby należy zastosować równoległe poddanie działaniu powietrza grupy kontrolne lub grupy kontrolne nośnika (zob. pkt 18).

Zwierzęta z grupy kontrolnej

18. Zwierzęta z równoległej ujemnej (poddanej działaniu powietrza) grupy kontrolnej powinny być traktowane w taki sam sposób jak zwierzęta z grupy badanej, wyjąwszy fakt, że są one narażane na działanie filtrowanego powietrza zamiast badanej substancji chemicznej. W przypadku gdy do ułatwienia wytworzenia atmosfery doświadczalnej stosowana jest woda lub inna substancja, do badania należy włączyć grupę kontrolną nośnika zamiast ujemnej (poddanej działaniu powietrza) grupy kontrolnej. W miarę możliwości wykorzystywanym

nośnikiem powinna być woda. Jeżeli w charakterze nośnika używana jest woda, zwierzęta z grupy kontrolnej powinny być narażone na działanie powietrza o takiej samej wilgotności względnej jak grupy narażone na działanie danej substancji. Wybór odpowiedniego nośnika powinien opierać się na właściwie przeprowadzonym badaniu wstępnym lub danych historycznych. Jeżeli toksyczność nośnika nie jest dobrze znana, kierownik badania może postanowić o zastosowaniu zarówno ujemnej (poddanej działaniu powietrza) grupy kontrolnej, jak i grupy kontrolnej nośnika, lecz jest to zdecydowanie odradzane. Jeśli dane historyczne wskazują na to, że nośnik jest nietoksyczny, nie ma potrzeby stosowania ujemnej (poddanej działaniu powietrza) grupy kontrolnej i należy jedynie wykorzystać grupę kontrolną nośnika. Jeśli badanie wstępne badanej substancji chemicznej zawartej w nośniku nie wskazuje na toksyczność, wynika z tego, że dany nośnik jest nietoksyczny przy badanym stężeniu i że należy zastosować grupę kontrolną tego nośnika.

WARUNKI NARAŻENIA NA DZIAŁANIE SUBSTANCJI

Stosowanie stężeń

19. Zwierzęta są narażane na działanie badanej substancji chemicznej w postaci gazu, pary, aerozolu lub ich mieszaniny. Stan fizyczny, który ma być przedmiotem badania, zależy od właściwości fizykochemicznych badanej substancji chemicznej, wybranych stężeń lub formy fizycznej, która najprawdopodobniej będzie występować podczas postępowania z badaną substancją chemiczną i jej stosowania. Substancje chemiczne o charakterze higroskopijnym oraz chemicznie reaktywne należy badać w suchej atmosferze. Należy zachować ostrożność, aby uniknąć osiągnięcia stężenia wybuchowego. Cząstki stałe można poddawać procesom mechanicznym w celu zmniejszenia wielkości cząstek. Dalsze wytyczne przedstawiono w GD 39 (2).

Rozkład wielkości cząstek

20. W odniesieniu do wszystkich aerozoli oraz par, które mogą skraplać się, tworząc aerozole, należy dokonać klasyfikacji cząstek według wielkości. W celu umożliwienia narażenia wszystkich odpowiednich części dróg oddechowych na działanie danej substancji zalecane są aerozole o średnicy aerodynamicznej mediany rozkładu masowego (MMAD) wynoszącej od 1 do 3 μm przy geometrycznym standardowym odchyleniu (σ_g) równym od 1,5 do 3,0 (4). Należy dążyć do osiągnięcia tej normy, jednak w razie niemożności jej osiągnięcia trzeba przedstawić specjalistyczną opinię. Na przykład cząstki par metali będą mniejsze od tej normy, a naładowane cząstki i włókna mogą ją przekraczać.

Przygotowywanie badanej substancji chemicznej w nośniku

21. Najlepiej byłoby, gdyby badana substancja chemiczna była analizowana bez nośnika. Jeżeli w celu osiągnięcia odpowiedniego stężenia i wielkości cząstek badanej substancji chemicznej konieczne jest stosowanie nośnika, preferowanym nośnikiem powinna być woda. Zawsze kiedy badana substancja chemiczna jest rozpuszczona w nośniku, należy wykazać jej stabilność.

MONITOROWANIE WARUNKÓW NARAŻENIA NA DZIAŁANIE SUBSTANCJI

Przepływ powietrza w komorze

22. Przepływ powietrza przez komorę inhalacyjną powinien być dokładnie kontrolowany, monitorowany w sposób ciągły i rejestrowany przynajmniej co godzinę podczas każdego narażenia. Monitorowanie w czasie rzeczywistym stężenia (lub jego czasowej stabilności) badanej substancji w atmosferze doświadczalnej jest całościowym pomiarem wszystkich parametrów dynamicznych i stanowi pośredni sposób kontrolowania wszystkich istotnych dynamicznych parametrów inhalacyjnych. Jeśli stężenie jest monitorowane w czasie rzeczywistym, częstotliwość pomiaru przepływu powietrza może być zmniejszona do jednego pomiaru dziennie na narażenie. Szczególną uwagę należy zwrócić na unikanie ponownego wdychania w komorach służących do narażania tylko przez nos. Stężenie tlenu powinno wynosić co najmniej 19 %, a stężenie dwutlenku węgla nie powinno przekraczać 1 %. Jeżeli istnieje powód, by przypuszczać, że norma ta nie może zostać osiągnięta, należy mierzyć stężenia tlenu i dwutlenku węgla. Jeśli w pierwszym dniu narażenia pomiary wykażą, że stężenia tych gazów są odpowiednie, dalsze pomiary nie powinny być konieczne.

Temperatura i wilgotność względna w komorze

23. Temperatura w komorze powinna być utrzymywana na poziomie 22 ± 3 °C. Wilgotność względna w strefie oddychania zwierząt powinna być stale monitorowana i rejestrowana co godzinę podczas każdego narażenia, jeżeli to możliwe, zarówno w przypadku narażenia tylko przez nos, jak i narażenia całego ciała. Wilgotność względna powinna być utrzymywana w przedziale od 30 do 70 %, lecz może to być albo nieosiągalne (np. przy badaniu mieszanin na bazie wody), albo niemierzalne z powodu interferencji badanej substancji chemicznej z metodą badawczą.

Badana substancja chemiczna: stężenie nominalne

24. Stężenie nominalne w komorze inhalacyjnej powinno być obliczane i rejestrowane, gdy tylko jest to możliwe. Stężenie nominalne to masa wprowadzonej badanej substancji chemicznej podzielona przez całkowitą objętość powietrza przepuszczonego przez system komory inhalacyjnej. Stężenie nominalne nie służy do charakteryzowania narażenia zwierząt, lecz porównanie stężenia nominalnego i stężenia rzeczywistego umożliwia określenie w przybliżeniu efektywności układu badawczego, a tym samym może być używane do wykrywania problemów z funkcjonowaniem tego układu.

Badana substancja chemiczna: stężenie rzeczywiste

25. Stężenie rzeczywiste to stężenie badanej substancji chemicznej w próbkach pobranych w strefie oddychania zwierząt w komorze inhalacyjnej. Stężenie rzeczywiste można obliczyć za pomocą metod specyficznych (np. bezpośredniego pobierania próbek, metod adsorpcyjnych lub z wykorzystaniem reaktywności chemicznej, a następnie charakterystyki analitycznej) lub metod niespecyficznych, takich jak analiza grawimetryczna przy zastosowaniu filtra. Zastosowanie metody grawimetrycznej jest dopuszczalne tylko w przypadku jednoskładnikowych aerozoli proszkowych lub aerozoli cieczy o niskiej lotności i powinno być poparte odpowiednią charakterystyką badanej substancji chemicznej opracowaną przed badaniem. Stężenie wieloskładnikowego aerozolu proszkowego także można określić za pomocą metody grawimetrycznej. Wymaga to jednak danych analitycznych, które dowodzą, że skład materiału w powietrzu jest podobny do materiału wyjściowego. Jeśli te informacje nie są dostępne, konieczna może być ponowna analiza badanej substancji chemicznej (najlepiej w stanie zawieszonym w powietrzu) w regularnych odstępach czasu w trakcie trwania badania. W przypadku środków w aerozolu, które mogą parować lub sublimować, należy wykazać, że wszystkie fazy zebrano przy użyciu wybranej metody.
26. O ile to możliwe, przez cały czas trwania badania należy używać jednej partii badanej substancji chemicznej, a badana próbka powinna być przechowywana w warunkach zapewniających zachowanie jej czystości, jednorodności i stabilności. Przed rozpoczęciem badania należy scharakteryzować badaną substancję chemiczną, w tym określić jej czystość oraz, jeżeli jest to technicznie możliwe, tożsamość i ilości zidentyfikowanych domieszek i zanieczyszczeń. Można to przedstawić m.in. za pomocą następujących danych: czasu retencji i względnej powierzchni sygnału, masy cząsteczkowej uzyskanej w drodze spektrometrii masowej lub chromatografii gazowej bądź innych oszacowań. Mimo że oznaczenie tożsamości badanej próbki nie należy do obowiązków laboratorium badawczego, rozsądne może być potwierdzenie przez to laboratorium charakterystyki, którą przedstawił sponsor, przynajmniej w ograniczonym zakresie (np. co do koloru, cech fizycznych itp.).
27. Podczas badania należy utrzymywać możliwie niezmienną atmosferę. W celu wykazania stabilności warunków narażenia można wykorzystać urządzenie umożliwiające monitorowanie w czasie rzeczywistym, takie jak fotometr w przypadku aerozoli lub analizator węglowodorów całkowitych w przypadku par. Stężenie rzeczywiste w komorze powinno być mierzone co najmniej 3 razy w ciągu każdego dnia narażenia dla każdego poziomu narażenia. Jeśli nie jest to możliwe ze względu na ograniczone natężenie przepływu powietrza lub niskie stężenie, dopuszczalne jest pobieranie jednej próbki na okres narażenia. Najlepiej byłoby, gdyby w takim przypadku próbka była pobierana przez cały okres narażenia. Wartości stężeń w komorze dla poszczególnych próbek nie powinny odbiegać od średniego stężenia w komorze o więcej niż $\pm 10\%$ dla gazów i par oraz o więcej niż $\pm 20\%$ dla aerozoli ciekłych lub stałych. Należy obliczyć i podać okres wyrównania stężeń w komorze (t_{95}). Czas trwania narażenia obejmuje czas wprowadzania badanej substancji chemicznej do komory. Uwzględnia się w tym okres wyrównania stężeń w komorze (t_{95}) i czas rozpadu. Wytyczne dotyczące szacowania t_{95} można znaleźć w GD 39 (2).
28. W przypadku bardzo złożonych mieszanin składających się z gazów/par i aerozoli (np. w przypadku atmosfery spalania i badanych substancji chemicznych wydzielanych ze specjalnych produktów/urządzeń do zastosowania końcowego) każda faza może zachowywać się inaczej w komorze inhalacyjnej. W związku z tym należy wybrać co najmniej jedną substancję wskaźnikową (analit) każdej fazy (gaz/pary i aerozol), zwykle główny składnik aktywny w mieszaninie. Jeżeli badana substancja chemiczna jest mieszaniną, należy podać stężenie analityczne w odniesieniu do całej mieszaniny, a nie tylko składnika aktywnego lub substancji wskaźnikowej (analitu). Dodatkowe informacje na temat stężeń rzeczywistych można znaleźć w GD 39 (2).

Badana substancja chemiczna: rozkład wielkości cząstek

29. Rozkład wielkości cząstek aerozoli należy określać co najmniej raz w tygodniu w odniesieniu do każdego poziomu stężenia za pomocą impaktora kaskadowego lub innego instrumentu takiego jak aerodynamiczny spektrometr pomiaru cząstek. Jeżeli można wykazać równoważność wyników uzyskanych za pośrednictwem impaktora kaskadowego i innego instrumentu, to ten inny instrument może być stosowany przez cały okres badania.
30. W celu potwierdzenia sprawności zatrzymywania cząstek przez instrument główny należy równoległe do tego instrumentu stosować drugie urządzenie, takie jak filtr grawimetryczny lub odpylacz/belkotka. Stężenie masowe uzyskane na podstawie analizy wielkości cząstek powinno mieścić się w rozsądnych granicach stężenia masowego uzyskanego poprzez analizę filtrów [zob. GD 39 (2)]. Dalsze pomiary potwierdzające można pominąć, jeśli można wykazać równoważność w odniesieniu do wszystkich stężeń badanych w początkowej fazie badania. Ze względu na dobrostan zwierząt należy podjąć środki mające na celu zminimalizowanie ilości danych niejednoznacznych, które mogą spowodować konieczność powtórzenia badania.
31. Klasyfikację cząstek według wielkości należy przeprowadzić w odniesieniu do par, jeżeli istnieje jakakolwiek możliwość tworzenia się aerozolu wskutek kondensacji par lub jeśli cząstki są wykrywane w atmosferze parowej mającej potencjał tworzenia faz mieszaných.

OBSERWACJE

32. Zwierzęta powinny być poddane obserwacji klinicznej przed okresem narażenia, w jego trakcie i po nim. W zależności od reakcji zwierząt podczas narażenia wskazane może być częstsze dokonywanie obserwacji. Jeżeli obserwacja zwierząt jest utrudniona wskutek zastosowania rur unieruchamiających zwierzęta, słabo oświetlonych komór do narażenia całego ciała lub nieprzejrzystości powietrza, zwierzęta powinny być uważnie obserwowane po narażeniu. W ramach obserwacji przed kolejnym dniem narażenia można ocenić odwracalność lub nasilenie skutków toksycznych.
33. Wszystkie obserwacje są systematycznie zapisywane, przy czym w odniesieniu do każdego zwierzęcia prowadzone są indywidualne rejestry. W przypadku uśmiercenia zwierząt z przyczyn humanitarnych lub stwierdzenia u nich zgonu należy możliwie jak najdokładniej zapisać czas zgonu.
34. Obserwacje zwierząt w klatkach powinny obejmować zmiany skóry i sierści, oczu i błon śluzowych; zmiany w układzie oddechowym i układzie krążenia; zmiany w układzie nerwowym oraz zmiany w aktywności somatycznej i sposobie zachowania. Należy poświęcić uwagę obserwacjom drżenia, konwulsji, ślinotoku, biegunki, letargu, snu i śpiączki. Pomiar temperatury w odbycie może dostarczyć dodatkowych dowodów odruchowego spowolnienia oddechu lub hipo-/hipertermii w związku z poddawaniem działaniu substancji lub przetrzymywaniem w zamknięciu. W protokole badania można uwzględnić dodatkowe oceny, takie jak dotyczące: kinetyki, biomonitoringu, czynności płuc, zatrzymywania słabo rozpuszczalnych substancji, które gromadzą się w tkance płuc, oraz zmian w zachowaniu.

MASA CIAŁA

35. Masę ciała poszczególnych zwierząt należy odnotować tuż przed pierwszym narażeniem (dzień 0), następnie dwa razy w tygodniu (na przykład w piątki i poniedziałki, aby wykazać zdrowienie przez weekend, kiedy nie dochodzi do narażenia, lub w odstępach czasu pozwalających na ocenę toksyczności ogólnoustrojowej) oraz w chwili zgonu lub eutanazji. Jeżeli w ciągu pierwszych 4 tygodni nie wystąpią żadne skutki, przez pozostały czas badania masę ciała można mierzyć co tydzień. Zwierzęta z grupy satelitarnej (grupy w badaniu odwracalności) (jeżeli są wykorzystywane) należy ważyć co tydzień przez cały okres zdrowienia. Na koniec badania wszystkie zwierzęta należy zważyć tuż przed uśmierceniem, aby umożliwić obiektywne obliczenie stosunku masy poszczególnych organów do masy ciała.

SPOŻYCIE POKARMU I WODY

36. Spożycie pokarmu należy mierzyć raz w tygodniu. Spożycie wody również można mierzyć.

PATOLOGIA KLINICZNA

37. Oceny z zakresu patologii klinicznej należy przeprowadzać dla wszystkich zwierząt, w tym zwierząt z grupy satelitarnej (grupy w badaniu odwracalności), gdy są one uśmiercane. Należy odnotować odstęp czasu pomiędzy zakończeniem narażenia a pobraniem krwi, szczególnie gdy odtworzenie danego punktu końcowego jest szybkie. Pobranie próbek po zakończeniu narażenia wskazane jest w przypadku tych parametrów, które charakteryzują się krótkim okresem półtrwania w osoczu (np. COHb, CHE i MetHb).
38. Tabela 1 zawiera wykaz parametrów analizy patologicznej, które są na ogół wymagane we wszystkich badaniach toksykologicznych. Badanie moczu nie jest wymagane jako badanie rutynowe, lecz może być wykonane, gdy zostanie to uznane za przydatne na podstawie spodziewanej lub obserwowanej toksyczności. Kierownik badania może postanowić o ocenie dodatkowych parametrów, aby lepiej scharakteryzować toksyczność badanej substancji chemicznej (np. pseudocholinesterazy, lipidów, hormonów, równowagi kwasowo-zasadowej, metemoglobinę lub ciałek Heintza, kinazy kreatynowej, stosunku komórek mieloidalnych do erytroidalnych, tropoininy, gazów krwi tętniczej, dehydrogenazy mleczanowej, dehydrogenazy sorbitolowej, dehydrogenazy glutaminianowej oraz gamma-glutamylotranspeptydazy).

Tabela 1

Standardowe parametry analizy patologicznej

| Hematologia | |
|--|---|
| Liczba czerwonych krwinek | Całkowita liczba leukocytów |
| Hematokryt | Różnicowa liczba leukocytów |
| Stężenie hemoglobiny | Liczba płytek krwi |
| Średnia masa hemoglobiny w krwince czerwonej | Krzepliwość (wybrać jedną opcję): |
| Średnia objętość krwinki czerwonej | — Czas protrombinowy |
| Średnie stężenie hemoglobiny w krwince czerwonej | — Czas krzepnięcia |
| Retikulocyty | — Czas częściowej tromboplastyny po aktywacji |

| Chemia kliniczna | |
|---|----------------------------------|
| Glukoza (*) | Aminotransferaza alaninowa |
| Cholesterol całkowity | Aminotransferaza asparaginianowa |
| Trójglicerydy | Fosfataza alkaliczna |
| Azot mocznikowy we krwi | Potas |
| Bilirubina całkowita | Sód |
| Kreatynina | Wapń |
| Białko całkowite | Fosfor |
| Albumina | Chlorek |
| Globulina | |
| Badanie moczu (opcjonalne) | |
| Wygląd (barwa i mętność) | Białko całkowite |
| Objętość | Glukoza |
| Ciężar właściwy lub osmolalność | Krew/komórki krwi |
| pH | |
| (*) Ponieważ długi okres wstrzymywania podawania pokarmu może prowadzić do błędów systematycznych w pomiarach glukozy u zwierząt poddawanych działaniu substancji w porównaniu ze zwierzętami z grupy kontrolnej, kierownik badania powinien zdecydować, czy wstrzymanie karmienia zwierząt jest właściwe. Jeżeli stosowane jest wstrzymanie podawania pokarmu, jego okres powinien być odpowiedni dla wykorzystywanych gatunków zwierząt; w przypadku szczura może to być 16 h (niekarmienie przez noc). Oznaczenie glukozy na czczo można przeprowadzić po wstrzymaniu podawania pożywienia przez całą noc w ciągu ostatniego tygodnia narażenia lub po całonocnym niekarmieniu przed sekcją zwłok (w tym ostatnim przypadku wraz z pomiarem wszystkich innych parametrów analizy patologicznej). | |

39. Jeżeli istnieją dowody na to, że dolne drogi oddechowe (tj. pęcherzyki płucne) są głównym miejscem osadzania się i zatrzymywania danej substancji, preferowaną techniką ilościowej analizy hipotetycznych parametrów efektu dawki związanych z zapaleniem pęcherzyków płucnych, zapaleniem płuc i fosfolipidozą może być płukanie oskrzelowo-pęcherzykowe. Umożliwia to właściwe zbadanie zależności dawka-odpowiedź i zmian uszkodzeń pęcherzyków płucnych w funkcji czasu. Popłuczyny oskrzelowo-pęcherzykowe można badać pod kątem całkowitej i różnicowej liczby leukocytów, białka całkowitego oraz dehydrogenazy mleczanowej. Innymi parametrami, które można wziąć pod uwagę, są te, które wskazują na uszkodzenia lizosomów, fosfolipidozę, zwłóknienie oraz stan zapalny wskutek podrażnienia lub stan alergiczny, który może wymagać oznaczenia cytokin/chemokin prozapalnych. Pomiary popłuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych na ogół uzupełniają wyniki badań histopatologicznych, lecz nie mogą ich zastępować. Wytyczne dotyczące przeprowadzania płukania oskrzelowo-pęcherzykowego można znaleźć w GD 39 (2).

BADANIE OFTALMOLOGICZNE

40. Badania oftalmologiczne dna oka, refrakcji, tęczówki i spojówki powinny być przeprowadzane za pomocą oftalmoskopu lub równoważnego urządzenia u wszystkich zwierząt przed podaniem badanej substancji chemicznej, a w przypadku wszystkich grup otrzymujących wysokie stężenie substancji i kontrolnych na zakończenie badania. W przypadku wykrycia zmian w oczach należy przebadać wszystkie zwierzęta w pozostałych grupach, w tym w grupie satelitarnej (grupie w badaniu odwracalności).

WYRAŹNE ZMIANY PATOLOGICZNE I MASA ORGANÓW

41. Wszystkie badane zwierzęta, w tym te, które padły podczas badania lub zostały wyeliminowane z badania ze względu na ich dobrostan, powinny zostać poddane całkowitemu wykrwawieniu (jeżeli to możliwe) i pełnemu rozpoznaniu histopatologicznemu. Należy odnotować czas pomiędzy zakończeniem ostatniego narażenia każdego zwierzęcia a jego uśmierceniem. Jeżeli sekcji zwłok nie można przeprowadzić natychmiast po znalezieniu martwego zwierzęcia, zwierzę należy schłodzić (nie zamrozić) do temperatury wystarczająco niskiej do zminimalizowania autolizy. Sekcję zwłok należy przeprowadzić możliwie szybko, zwykle w ciągu dnia lub dwóch. W odniesieniu do każdego zwierzęcia należy zarejestrować wszystkie makroskopowe zmiany patologiczne ze szczególnym uwzględnieniem wszelkich zmian w drogach oddechowych.
42. Tabela 2 zawiera wykaz organów i tkanek, które należy zachować w odpowiednim środku w trakcie pełnego rozpoznania histopatologicznego na potrzeby badania histopatologicznego. Organy i tkanki [wymienione w nawiasach kwadratowych] oraz wszelkie inne organy i tkanki można zachować według uznania kierownika badania. Organy wymienione **czcionką pogrubioną** należy okroić i zważyć w stanie wilgotnym niezwłocznie po przeprowadzeniu sekcji w celu uniknięcia wyschnięcia. Tarczycę i jądra należy zważyć wyłącznie wówczas, gdy jest to konieczne, ponieważ okrajanie artefaktów może utrudnić ocenę histopatologiczną. Tkanki i organy należy utwalić w 10 % roztworze buforowanej formaliny lub innej odpowiedniej substancji utralającej niezwłocznie po przeprowadzeniu sekcji zwłok i nie później niż na 24–48 godzin przed okrojeniem, w zależności od stosowanej substancji utralającej.

Tabela 2

Organy i tkanki zachowywane w trakcie pełnego rozpoznania histopatologicznego

| | |
|--|---|
| Nadnercza | Przełyk |
| Aorta | [Opuszka węchowa] |
| Szypik kostny (lub świeży aspirat) | Jajniki |
| Mózg (w tym wycinki kresomózgowia, mózdzku i rdzenia/mostu) | Trzustka |
| Jelito ślepe | Przytarczyce |
| Okrężnica | Nerw obwodowy (kulszowy lub piszczelowy, najlepiej blisko mięśnia) |
| Dwunastnica | Przysadka |
| [Najądrza] | Prostata |
| [Oczy (siatkówka, nerw wzrokowy) i powieki] | Odbytnica |
| Kość udowa i staw kolanowy | Gruzoły ślinowe |
| Woreczek żółciowy (jeżeli występuje) | Pęcherzyki nasienne |
| [Gruzoły przyocne] | Skóra |
| Serce | Rdzeń kręgowy (odcinek szyjny, śródpiersiowy i lędźwiowy) |
| Jelito kręte | Śledziona |
| Jelito czcze | Mostek |
| Nerki | Żołądek |
| [Gruzoły łzowe (zewnątrzcodołowe)] | Zęby |
| Krtań (3 poziomy, w tym podstawa nagłośni) | Jądra |
| Wątroba | Grasica |
| Płuco (wszystkie płaty na jednym poziomie, w tym oskrzela główne) | Tarczyca |
| Węzły chłonne z okolicy wnęki płuca, szczególnie w przypadku badań słabo rozpuszczalnych badanych substancji chemicznych mających postać cząstek stałych. Na potrzeby bardziej pogłębionych badań lub badań immunologicznych można wziąć pod uwagę dodatkowe węzły chłonne, np. z części śródpiersiowej, szyjnej/podżuchwowej lub usznej | [Język] |
| Węzły chłonne (dystalne w stosunku do wrót zakażenia) | Tchawica (co najmniej 2 wycinki, w tym 1 wycinek pobrany podłużnie poprzez ostrogę i 1 wycinek pobrany poprzecznie) |
| Gruzoł mlekowy (u samic) | [Moczowód] |
| Mięsień (udo) | [Cewka moczowa] |
| Tkanki nosogardła (co najmniej 4 poziomy; 1 poziom ma obejmować przewód nosowo-gardłowy i tkankę limfatyczną związaną ze śluzówką nosa (NALT)) | Pęcherz moczowy |
| | Macica |
| | Organy docelowe |
| | Wszystkie makroskopowe zmiany patologiczne i masy |

43. Płuca należy usunąć w stanie nienaruszonym, zważyć i zaaplikować odpowiednią substancję utrwalającą pod ciśnieniem 20–30 cm wody celem zapewnienia utrzymania ich struktury (5). Wycinki należy pobrać dla wszystkich płatów na jednym poziomie, w tym z oskrzeli głównych, lecz w przypadku przeprowadzania płukania oskrzelowo-pęcherzykowego z nieprzepłukanego płatu należy pobrać wycinki na trzech poziomach (nie szeregowo).

44. Należy zbadać co najmniej 4 poziomy tkanek nosogardła, z których jeden powinien obejmować przewód nosowo-gardłowy (5) (6) (7) (8) (9), aby umożliwić odpowiednie zbadanie nabłonka płaskiego, przejściowego (oddechowego nieurzęsionego), oddechowego (oddechowego urzęsionego) i węchowego, a także tkanki limfaticznej związanej ze śluzówką nosa (NALT) (10) (11). Należy zbadać trzy poziomy krtani, a jeden z tych poziomów powinien obejmować podstawę nagłośni (12). Należy zbadać co najmniej dwa poziomy tchawicy, w tym pobrać jeden wycinek pobrany podłużnie przez ostrogę rozgałęzienia oskrzeli pozapłucnych i jeden wycinek pobrany poprzecznie.

HISTOPATOLOGIA

45. Ocenę histopatologiczną wszystkich organów i tkanek wymienionych w tabeli 2 należy przeprowadzić w odniesieniu do grupy kontrolnej i grupy otrzymującej wysokie stężenie substancji, a także wszystkich zwierząt, które padły lub zostały uśmiercone podczas badania. Szczególną uwagę należy zwrócić na drogi oddechowe, organy docelowe i makroskopowe zmiany patologiczne. Organy i tkanki zwierząt z grupy otrzymującej wysokie stężenie substancji, w których stwierdzono zmiany patologiczne, należy zbadać we wszystkich grupach. Kierownik badania może postanowić o przeprowadzeniu ocen histopatologicznych dodatkowych grup, aby wykazać wyraźną zależność stężenie-odpowiedź. Jeśli używa się grupy satelitarnej (grupy w badaniu odwracalności), należy przeprowadzić ocenę histopatologiczną wszystkich tkanek i organów, w których stwierdzono skutki podania substancji w grupach otrzymujących substancję badaną. W przypadku występowania nadmiernej liczby wczesnych zgonów lub innych problemów w grupie poddawanej wysokiemu narażeniu, które negatywnie wpływają na istotność danych, badania histopatologiczne należy przeprowadzić w grupie otrzymującej daną substancję o kolejnym, niższym stężeniu. Należy podjąć próbę skorelowania wyników całości obserwacji z wynikami badań mikroskopowych.

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Dane

46. W odniesieniu do każdego zwierzęcia należy przedstawić dane dotyczące masy ciała, spożycia pokarmu, patologii klinicznej, wyraźnych zmian patologicznych, masy organów i histopatologii. Dane z obserwacji klinicznych należy zestawić w postaci tabeli, przedstawiając w odniesieniu do każdej badanej grupy liczbę wykorzystanych zwierząt, liczbę zwierząt wykazujących specyficzne oznaki toksyczności, liczbę zwierząt padłych w trakcie trwania badania lub uśmierconych z przyczyn humanitarnych, czas zgonu poszczególnych zwierząt, opis skutków toksycznych oraz ich przebieg w czasie i odwracalność, a także wyniki sekcji zwłok. Wszystkie wyniki ilościowe i dodatkowe należy ocenić za pomocą właściwej metody statystycznej. Można zastosować dowolną ogólnie przyjętą metodę statystyczną, przy czym wyбору metod statystycznych należy dokonać podczas przygotowywania projektu badania.

Sprawozdanie z badania

47. Sprawozdanie z badania powinno w stosownych przypadkach zawierać następujące informacje:

Badane zwierzęta i ich hodowla

- opis warunków przetrzymywania w klatkach, w tym: liczba (lub zmiana liczby) zwierząt na klatkę, ściółka, temperatura otoczenia i wilgotność względna, fotoperiod i określenie diety,
- wykorzystany gatunek/szczep oraz uzasadnienie zastosowania gatunków innych niż szczur. Można przedstawić źródło i dane historyczne, jeżeli dotyczą one zwierząt poddanych podobnemu narażeniu oraz warunkom przebywania i żywieniowym,
- liczba, wiek i płeć zwierząt,
- metoda randomizacji,
- opis wszelkich przygotowań przed badaniem, w tym diety, kwarantanny i leczenia chorób.

Badana substancja chemiczna

- cechy fizyczne, czystość oraz w stosownych przypadkach właściwości fizykochemiczne (w tym izomeryzacja),
- dane identyfikacyjne i numer w rejestrze Chemical Abstract Services (CAS), jeżeli jest znany.

Nośnik

- uzasadnienie zastosowania nośnika oraz uzasadnienie wyboru nośnika (jeżeli jest inny niż woda),
- dane historyczne lub równoległe, wykazujące, że nośnik nie zakłóca wyniku badania.

Komora inhalacyjna

- szczegółowy opis komory inhalacyjnej, w tym jej rozmiary i schemat,
- źródło i opis wyposażenia wykorzystywanego do celów narażenia, jak również do wytwarzania atmosfery,
- wyposażenie do pomiaru temperatury, wilgotności, rozmiaru cząstek i stężenia rzeczywistego,
- źródło powietrza i system klimatyzacji,
- metody kalibracji wyposażenia w celu zapewnienia jednorodnej atmosfery na potrzeby badania,
- różnica ciśnienia (dodatnia lub ujemna),
- porty narażenia w komorze (narażenie tylko przez nos); lokalizacja zwierząt w komorze (narażenie całego ciała),
- stabilność atmosfery doświadczalnej,
- lokalizacja czujników temperatury i wilgotności oraz pobieranie próbek powietrza w komorze,
- oczyszczanie dostarczanego/odprowadzanego powietrza,
- natężenie przepływu powietrza, natężenie przepływu powietrza/port narażenia (narażenie tylko przez nos) lub ładunek zwierząt/komorę (narażenie całego ciała),
- okres wyrównania stężeń w komorze inhalacyjnej (t_{95}),
- liczba zmian objętości na godzinę,
- urządzenia pomiarowe (w stosownych przypadkach).

Dane dotyczące narażenia

- uzasadnienie wyboru docelowego stężenia w badaniu głównym,
- stężenia nominalne (całkowita masa badanej substancji chemicznej wprowadzonej do komory inhalacyjnej podzielona przez objętość powietrza przepuszczonego przez komorę),
- rzeczywiste stężenia badanej substancji chemicznej w próbkach ze strefy oddychania zwierząt; w przypadku mieszanin, które tworzą heterogeniczne formy fizyczne (gazy, pary, aerozole), każdą substancję można przeanalizować oddzielnie,
- wszystkie stężenia substancji w powietrzu należy podawać w jednostkach masy (mg/l, mg/m³ itd.), a nie w jednostkach objętości (ppm, ppb itd.),
- rozkład wielkości cząstek, średnica aerodynamiczna mediany rozkładu masowego (MMAD) oraz geometryczne standardowe odchylenie (σ_g), w tym metody ich obliczania. Należy odnotować poszczególne analizy wielkości cząstek.

Warunki badania

- szczegółowe informacje na temat przygotowania badanej substancji chemicznej, w tym szczegóły dotyczące wszelkich procedur zastosowanych w celu zmniejszenia rozmiaru cząstek ciał stałych lub przygotowania roztworów badanej substancji chemicznej,
- opis (najlepiej wraz ze schematem) wyposażenia wykorzystywanego do wytworzenia atmosfery na potrzeby badania i narażenia zwierząt na jej działanie,
- szczegółowe informacje na temat wyposażenia stosowanego do monitorowania temperatury, wilgotności i przepływu powietrza w komorze (tj. opracowanie krzywej kalibracyjnej),
- szczegółowe informacje na temat wyposażenia stosowanego do pobierania próbek na potrzeby określenia stężenia w komorze i rozkładu wielkości cząstek,
- szczegółowe informacje na temat zastosowanej metody analizy chemicznej oraz walidacji metody (w tym wydajność odzysku badanej substancji chemicznej ze środka do pobierania próbek),

- metoda randomizacji przypisywania zwierząt do grupy badanej i grupy kontrolnej,
- szczegółowe informacje na temat jakości pożywienia i wody (włączając w to rodzaj/źródło diety oraz źródło wody),
- uzasadnienie wyboru badanych stężeń.

Wyniki

- tabelaryczne zestawienie temperatury, wilgotności i przepływu powietrza w komorze,
- tabelaryczne zestawienie danych dotyczących nominalnego i rzeczywistego stężenia w komorze,
- tabelaryczne zestawienie danych dotyczących rozmiaru cząstek, w tym danych dotyczących gromadzenia próbek analitycznych, rozkładu wielkości cząstek oraz obliczenia MMAD i σ_g ,
- tabelaryczne zestawienie danych dotyczących reakcji i poziomu stężenia dla każdego zwierzęcia (tj. zwierząt wykazujących oznaki toksyczności, w tym śmiertelność, rodzaj, ostrość, czas pojawienia się i czas trwania objawów),
- tabelaryczne zestawienia masy poszczególnych zwierząt,
- tabelaryczne zestawienia spożycia pokarmu,
- tabelaryczne zestawienie danych z zakresu patologii klinicznej,
- wyniki sekcji zwłok oraz badań histopatologicznych w odniesieniu do każdego zwierzęcia, jeżeli są dostępne.

Omówienie i interpretacja wyników

- szczególny nacisk należy położyć na opis metod zastosowanych w celu spełnienia kryteriów niniejszej metody badawczej, np. dotyczących stężenia granicznego lub rozmiaru cząstek,
- należy uwzględnić respirabilność cząstek w świetle wyników ogólnych, szczególnie jeżeli nie można było spełnić kryterium rozmiaru cząstek,
- w ogólnej ocenie badania należy uwzględnić spójność metod zastosowanych w celu określenia nominalnego i rzeczywistego stężenia oraz relacji między stężeniem rzeczywistym a nominalnym,
- należy uwzględnić prawdopodobną przyczynę zgonu i dominujący sposób działania (ogólnoustrojowy w porównaniu z miejscowym),
- należy przedstawić wyjaśnienie, jeżeli zaistniała konieczność humanitarnego uśmiercenia zwierząt wykazujących oznaki bólu lub objawy ostrego i przewlekłego stresu, zgodnie z kryteriami zawartymi w wytycznych OECD dotyczących humanitarnego punktu końcowego (3),
- należy określić organy docelowe,
- należy określić NOAEL i LOAEL.

BIBLIOGRAFIA:

- (1) OECD (1981). *Subchronic Inhalation Toxicity Testing*, pierwotna wersja dotyczącej badań wytycznej OECD nr 413, Dyrekcja ds. Środowiska, OECD, Paryż.
- (2) OECD (2009). *Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing*, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment nr 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paryż.
- (3) OECD (2000). *Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation*, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment nr 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paryż.
- (4) Whalan E i Redden JC (1994). *Interim Policy for Particle Size and Limit Concentration Issues in Inhalation Toxicity Studies*. Biuro ds. Programów Stosowania Pestycydów, Agencja Ochrony Środowiska Stanów Zjednoczonych.

-
- (5) Dungworth DL, Tyler WS, Plopper CE (1985). Morphological Methods for Gross and Microscopic Pathology (rozdział 9) w: *Toxicology of Inhaled Material*, Witschi, H.P. i Brain, J.D. (red.), Springer Verlag Heidelberg, s. 229–258.
 - (6) Young JT (1981). Histopathological examination of the rat nasal cavity. *Fundam. Appl. Toxicol.* 1: 309–312.
 - (7) Harkema JR (1990). Comparative pathology of the nasal mucosa in laboratory animals exposed to inhaled irritants. *Environ. Health Perspect.* 85: 231–238.
 - (8) Woutersen RA, Garderen-Hoetmer A, van Slootweg PJ, Feron VJ (1994). Upper respiratory tract carcinogenesis in experimental animals and in humans. W: Waalkes MP i Ward JM (red.) *Carcinogenesis. Target Organ Toxicology Series*, Raven Press, Nowy Jork, 215–263.
 - (9) Mery S, Gross EA, Joyner DR, Godo M, Morgan KT (1994). Nasal diagrams: A tool for recording the distribution of nasal lesions in rats and mice. *Toxicol. Pathol.* 22: 353–372.
 - (10) Kuper CF, Koornstra PJ, Hameleers DMH, Biewenga J, Spit BJ, Duijvestijn AM, Breda Vriesman van PJC, Sminia T (1992). The role of nasopharyngeal lymphoid tissue. *Immunol. Today* 13: 219–224.
 - (11) Kuper CF, Art. JHE, Feron VJ (2003). Toxicity to nasal-associated lymphoid tissue. *Toxicol. Lett.* 140–141: 281–285.
 - (12) Lewis DJ (1981). Mitotic Indices of Rat Laryngeal Epithelia. *Journal of Anatomy* 132(3): 419–428.
 - (13) Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1272/2008 z dnia 16 grudnia 2008 r. w sprawie klasyfikacji, oznakowania i pakowania substancji i mieszanin, zmieniające i uchylające dyrektywy 67/548/EWG i 1999/45/WE oraz zmieniające rozporządzenie (WE) nr 1907/2006 (Dz.U. L 353 z 31.12.2008, s. 1).
-

Dodatek 1

DEFINICJA

Badana substancja chemiczna: jakakolwiek substancja lub mieszanina badana za pomocą niniejszej metody badawczej.

B.30. BADANIA TOKSYCZNOŚCI PRZEWLEKŁEJ

WPROWADZENIE

1. Niniejsza metoda badawcza jest równoważna metodzie opisanej w dotyczącej badań wytycznej OECD nr 452 (OECD TG 452) (2009). Pierwotną TG nr 452 przyjęto w 1981 r. Opracowanie niniejszej zmienionej metody badawczej B.30 uznano za konieczne w celu odzwierciedlenia ostatnich zmian w dziedzinie dobrostanu zwierząt i wymogów regulacyjnych (1) (2) (3) (4). Aktualizację niniejszej metody badawczej B.30 przeprowadzono równoległe z zmianami rozdziału B.32 niniejszego załącznika, dotyczącego badań rakotwórczości, oraz rozdziału B.33 niniejszego załącznika, dotyczącego łączonych badań toksyczności przewlekłej/rakotwórczości, w celu uzyskania dodatkowych informacji na podstawie zwierząt wykorzystanych w badaniu oraz w celu zapewnienia dalszych szczegółowych informacji na temat doboru dawek. Niniejszą metodę badawczą opracowano w celu jej wykorzystywania w badaniach szerokiego zakresu chemikaliów, w tym pestycydów i chemikaliów przemysłowych.
2. Większość badań toksyczności przewlekłej przeprowadza się z wykorzystaniem gatunków gryzoni, w związku z czym niniejsza metoda badawcza przewidziana jest do stosowania przede wszystkim w badaniach z wykorzystaniem takich gatunków. W razie konieczności przeprowadzenia takich badań z wykorzystaniem gatunków innych niż gryzonie można także zastosować zasady i procedury określone w niniejszej metodzie badawczej, przy wprowadzeniu odpowiednich modyfikacji, wraz z zasadami i procedurami określonymi w rozdziale B.27 niniejszego załącznika, dotyczącym 90-dniowego badania toksyczności pokarmowej wywołanej powtarzanym dawkowaniem z wykorzystaniem gatunków innych niż gryzonie (5), zgodnie z wytycznymi OECD nr 116 dotyczącymi opracowywania i przeprowadzania badań toksyczności przewlekłej i rakotwórczości (6).
3. Trzy główne drogi podania stosowane w badaniach toksyczności przewlekłej to droga pokarmowa, dermalna i inhalacyjna. Wybór drogi podania zależy od fizycznych i chemicznych właściwości badanej substancji chemicznej oraz głównej drogi narażenia ludzi. Dodatkowe informacje na temat wyboru drogi narażenia przedstawiono w wytycznych OECD nr 116 (6).
4. W ramach niniejszej metody badawczej kładzie się nacisk na narażenie drogą pokarmową, która jest drogą najczęściej stosowaną w badaniach toksyczności przewlekłej. Przeprowadzenie długoterminowych badań obejmujących narażenie drogą dermalną lub inhalacyjną może być również konieczne do oceny ryzyka dla zdrowia ludzi lub wymagane w ramach pewnych systemów regulacji, jednak obydwie te drogi narażenia wymagają badań bardzo złożonych technicznie. Takie badania będą musiały zostać opracowane dla poszczególnych przypadków, jednak opisana w niniejszym rozdziale metoda badawcza mająca na celu ocenę i oszacowanie toksyczności przewlekłej przy pokarmowej drodze podania może stanowić podstawę dla protokołu badania z zastosowaniem inhalacyjnej lub dermalnej drogi podania, z zastrzeżeniem zaleceń dotyczących okresów poddawania działaniu substancji, parametrów klinicznych, parametrów analizy patologicznej itp. Dostępne są wytyczne OECD dotyczące podawania badanych substancji chemicznych drogą inhalacyjną (6) (7) i drogą dermalną (6). Podczas opracowywania badań uwzględniających dłuższy okres narażenia drogą inhalacyjną należy w szczególności wziąć pod uwagę rozdział B.8 niniejszego załącznika (8) oraz rozdział B.29 niniejszego załącznika (9), a także wytyczne OECD dotyczące badania ostrej toksyczności inhalacyjnej (7). W przypadku badań przeprowadzanych drogą dermalną należy uwzględnić rozdział B.9 niniejszego załącznika (10).
5. Badanie toksyczności przewlekłej dostarcza informacji na temat potencjalnych zagrożeń dla zdrowia, których pojawienie się jest prawdopodobne w przypadku narażenia powtarzającego się przez znaczną część długości życia gatunku wykorzystanego w badaniu. Badanie dostarczy informacji na temat skutków toksycznych badanej substancji chemicznej oraz wskaże organy docelowe i możliwość akumulacji. Badanie może także dostarczyć szacunkowych informacji na temat poziomu dawkowania, przy którym nie obserwuje się szkodliwych zmian, które to informacje można wykorzystać do ustalenia kryteriów bezpieczeństwa dla narażenia ludzi. Podkreśla się również konieczność uważnych obserwacji klinicznych zwierząt, aby uzyskać możliwie jak najwięcej informacji.
6. Cele badań w ramach niniejszej metody badawczej obejmują:
 - określenie toksyczności przewlekłej badanej substancji chemicznej,
 - określenie organów docelowych,
 - scharakteryzowanie zależności dawka-odpowiedź,
 - określenie poziomu dawkowania, przy którym nie obserwuje się szkodliwych zmian (NOAEL), lub punktu wyjścia dla ustalenia dawki wyznaczającej (BMD),
 - oszacowanie skutków toksyczności przewlekłej przy poziomach narażenia ludzi,
 - dostarczenie danych na potrzeby zbadania hipotez dotyczących sposobu działania (6).

ZAŁOŻENIA WSTĘPNE

7. Podczas oceny i oszacowania właściwości toksykologicznych badanej substancji chemicznej laboratorium badawcze powinno wziąć pod uwagę wszystkie dostępne informacje na temat badanej substancji chemicznej przed rozpoczęciem badania, aby opracować taki projekt badania, który umożliwi zbadanie potencjału wywołania toksyczności przewlekłej w sposób bardziej efektywny oraz zminimalizuje wykorzystanie zwierząt. Informacje, które będą pomocne w opracowywaniu projektu badania, obejmują tożsamość, strukturę chemiczną i właściwości fizykochemiczne badanej substancji chemicznej; wszelkie informacje na temat sposobu działania; wyniki wszelkich badań toksyczności *in vitro* lub *in vivo*; przewidywane zastosowania i potencjalne narażenie ludzi; dostępne dane dotyczące (Q)SAR oraz dane toksykologiczne dotyczące strukturalnie powiązanych związków; dostępne dane toksykokinetyczne (jeśli dostępne, dane dotyczące kinetyki jednorazowego podania i podania powtarzanego) oraz dane pochodzące z innych badań narażenia powtarzanego. Ocena toksyczności przewlekłej należy przeprowadzić wyłącznie po uzyskaniu wstępnych informacji na temat toksyczności na podstawie 28-dniowych lub 90-dniowych badań toksyczności wywołanej powtarzanym dawkowaniem. W kontekście ogólnej oceny potencjalnych niepożądanych skutków dla zdrowia wywołanych przez daną badaną substancję chemiczną w badaniu toksyczności przewlekłej należy rozważyć podejście oparte na etapach (11) (12) (13) (14).
8. Metody statystyczne najbardziej odpowiednie do analizy wyników, przy uwzględnieniu układu doświadczalnego i celów badania, należy ustalić przed rozpoczęciem badania. Wśród kwestii, jakie należy rozważyć, znajduje się pytanie, czy dane statystyczne powinny obejmować korektę uwzględniającą zwierzęta, które przeżyły, oraz analizę w przypadku przedwczesnego uśmiercenia jednej grupy lub większej liczby grup. Wytyczne dotyczące odpowiednich analiz statystycznych i kluczowe odniesienia do przyjętych na poziomie międzynarodowym metod statystycznych zawarto w wytycznych nr 116 (6), a także wytycznych nr 35 dotyczących analizy i ewaluacji badań toksyczności przewlekłej i rakotwórczości (15).
9. Podczas przeprowadzania badania toksyczności przewlekłej należy w każdym przypadku kierować się zasadami przewodnimi i czynnikami przedstawionymi w wytycznych OECD nr 19 dotyczących rozpoznawania, oceny i wykorzystania objawów klinicznych jako humanitarnego punktu końcowego w odniesieniu do zwierząt wykorzystywanych w badaniu oceny bezpieczeństwa (16), a zwłaszcza pkt 62 tego dokumentu. Punkt ten stanowi, że: *»[w] badaniach z zastosowaniem powtarzanej dawki, jeśli zwierzę wykazuje objawy kliniczne, które postępują, prowadząc do dalszego pogorszenia jego stanu, należy podjąć uzasadnioną decyzję, czy w sposób humanitarny uśmiercić takie zwierzę. Taka decyzja powinna opierać się na rozważeniu wartości informacji, jakie można uzyskać dzięki dalszemu utrzymywaniu takiego zwierzęcia w ramach badania, i uwzględniać ogólny stan takiego zwierzęcia. Jeśli zapadnie decyzja o pozostawieniu takiego zwierzęcia w badaniu, częstotliwość obserwacji należy w razie potrzeby zwiększyć. Można także tymczasowo zaprzestać dawkowania, jeśli nie wpłynie to w sposób niekorzystny na cel badania, a mniejszy cierpienie lub stres odczuwany przez zwierzę, lub też można zmniejszyć podawaną dawkę«.*
10. Szczegółowe wytyczne dotyczące zasad doboru dawek w przypadku badań toksyczności przewlekłej i rakotwórczości, a także omówienie takich zasad, można znaleźć w wytycznych nr 116 (6) oraz w publikacjach Międzynarodowego Instytutu Nauk Biologicznych (ILSI) (17) (18). Główna strategia doboru dawek zależy od głównego celu lub celów badania (pkt 6). Podczas doboru odpowiednich poziomów dawek należy zachować równowagę między kontrolą zagrożenia a określeniem reakcji na niskie dawki i ich istotnością. Ma to szczególne znaczenie w sytuacji, w której planuje się przeprowadzić łączone badanie toksyczności przewlekłej i rakotwórczości (rozdział B.33 niniejszego załącznika) (pkt 11).
11. Należy rozważyć przeprowadzenie łączonego badania toksyczności przewlekłej i rakotwórczości (rozdział B.33 niniejszego załącznika) zamiast przeprowadzania osobno badania toksyczności przewlekłej (niniejsza metoda badawcza B.30) i badania rakotwórczości (rozdział B.32 niniejszego załącznika). W porównaniu z przeprowadzaniem dwóch osobnych badań łączone badanie zapewnia większą efektywność pod względem czasu i kosztów, a jednocześnie nie obniża jakości danych na etapie badania toksyczności przewlekłej ani na etapie badania rakotwórczości. Przy przeprowadzaniu łączonego badania toksyczności przewlekłej i rakotwórczości (rozdział B.33 niniejszego załącznika) należy jednak zwrócić szczególną uwagę na zasady doboru dawek (pkt 9 i 20–25). Uznaje się także, że w przypadku pewnych ram regulacyjnych wymagane może być przeprowadzenie takich badań osobno.
12. Definicje stosowane w kontekście niniejszej metody badawczej można znaleźć na końcu tego rozdziału oraz w wytycznych nr 116 (6).

ZASADA BADANIA

13. Badaną substancję chemiczną podaje się codziennie w dawkach stopniowanych kilku grupom zwierząt doświadczalnych zazwyczaj przez okres 12 miesięcy, choć w zależności od wymogów regulacyjnych można wybrać także dłuższy lub krótszy czas trwania tego etapu badania (zob. pkt 33). Wybiera się wystarczająco długi czas trwania badania, aby umożliwić widoczne pojawienie się wszelkich skutków toksyczności kumulatywnej, jednocześnie unikając mogących wprowadzić w błąd skutków zmian wynikających z wieku. Odstępstwa od 12-miesięcznego czasu trwania narażenia należy uzasadnić, zwłaszcza w przypadku krótszych okresów. Badaną substancję chemiczną podaje się zazwyczaj drogą pokarmową, choć w niektórych przypadkach właściwe może być badanie z zastosowaniem drogi inhalacyjnej lub dermalnej. Projekt badania może obejmować także uśmiercanie w trakcie trwania doświadczenia, np. po upływie 3 i 6 miesięcy, oraz włączenie do badania dodatkowych grup zwierząt w celu umożliwienia takiego działania (zob. pkt 19). Podczas okresu podawania danej substancji zwierzęta obserwuje się uważnie w celu wykrycia objawów toksyczności. Zwierzęta, które padną lub zostaną uśmiercone podczas badania, są poddawane sekcji zwłok, a zwierzęta, które przeżyją, są po zakończeniu badania uśmiercane i poddawane sekcji zwłok.

OPIS METODY**Wybór gatunku zwierząt**

14. Niniejsza metoda badawcza obejmuje przede wszystkim ocenę i oszacowanie toksyczności przewlekłej u gryzoni (zob. pkt 2), chociaż uznaje się, że w ramach pewnych systemów regulacji wymagane mogą być podobne badania na gatunkach innych niż gryzonie. Wybór gatunku należy uzasadnić. Projekt badania i przeprowadzenie badań toksyczności przewlekłej z wykorzystaniem gatunków innych niż gryzonie, jeśli jest to wymagane, powinny opierać się na zasadach określonych w niniejszej metodzie badawczej, a także na zasadach określonych w rozdziale B.27 niniejszego załącznika, dotyczącym 90-dniowego badania toksyczności pokarmowej wywołanej powtarzanym dawkowaniem z wykorzystaniem gatunków innych niż gryzonie (5). Dodatkowe informacje na temat wyboru gatunku i szczepu przedstawiono w wytycznych nr 116 (6).
15. Preferowanym gatunkiem gryzoni w ramach niniejszej metody badawczej jest szczur, można jednak wykorzystać także inne gatunki, np. mysz. Szczury i myszy są jak dotąd preferowanymi zwierzętami doświadczalnymi z uwagi na ich względnie krótką długość życia, powszechne wykorzystywanie w badaniach farmakologicznych i toksykologicznych, podatność na powstawanie guzów, a także dostępność dostatecznie scharakteryzowanych szczepów. Z racji tych cech dostępne są znaczne ilości informacji na temat ich fizjologii i patologii. Zaleca się wykorzystanie zdrowych, młodych, dorosłych zwierząt pochodzących ze szczepów powszechnie wykorzystywanych w laboratoriach. Badanie toksyczności przewlekłej należy przeprowadzić z wykorzystaniem zwierząt z tego samego szczepu i źródła, z którego pochodziły zwierzęta wykorzystane we wstępnych badaniach toksyczności o krótszym czasie trwania. Samice powinny być nieródkami i nie mogą być w ciąży.

Warunki przetrzymywania i karmienia

16. Zwierzęta można przetrzymywać pojedynczo lub też w klatkach w małych grupach składających się z osobników tej samej płci; przetrzymywanie zwierząt pojedynczo należy rozważyć, wyłącznie jeśli jest to uzasadnione z naukowego punktu widzenia (19) (20) (21). Klatki należy rozmieścić w taki sposób, aby zminimalizować potencjalny wpływ ich układu. Temperatura w pomieszczeniach dla zwierząt doświadczalnych powinna wynosić 22 °C (\pm 3 °C). Chociaż wilgotność względna powinna wynosić co najmniej 30 % i pożądaną jest, by poza czasem czyszczenia pomieszczenia nie przekraczała 70 %, należy dążyć do utrzymania jej na poziomie 50–60 %. Oświetlenie powinno być sztuczne, w cyklu 12 godzin światła, 12 godzin ciemności. Do karmienia można stosować konwencjonalne pasze laboratoryjne z nieograniczonym dostępem do wody pitnej. Pasza powinna zaspokajać wszystkie potrzeby żywieniowe badanych gatunków, a obecna w niej zawartość pokarmowych substancji zanieczyszczających, w tym między innymi pozostałości pestycydów, trwałych zanieczyszczeń organicznych, fitoestrogenów, metali ciężkich i mikotoksyn, które mogą wpłynąć na wynik badania, powinna być możliwie jak najniższa. Okresowo należy generować informacje analityczne na temat poziomów substancji zanieczyszczających w składnikach odżywczych i pokarmowych, a przynajmniej na początku badania oraz w przypadku zmiany stosowanej partii. Takie informacje należy uwzględnić w sprawozdaniu końcowym. Informacje analityczne na temat wody pitnej stosowanej w badaniu należy przedstawić w podobny sposób. Na wybór pokarmu może mieć wpływ potrzeba zapewnienia odpowiedniej mieszaniny badanej substancji chemicznej, a także potrzeba zaspokojenia potrzeb żywieniowych zwierząt, jeśli badaną substancję chemiczną podaje się drogą pokarmową.

Przygotowanie zwierząt

17. Należy wykorzystać zdrowe zwierzęta aklimatyzowane do warunków laboratoryjnych przez co najmniej 7 dni oraz niepoddawane wcześniej procedurom doświadczalnym. W przypadku gryzoni dawkowanie substancji należy rozpocząć możliwie jak najszybciej po odsadzeniu i aklimatyzacji oraz najlepiej zanim zwierzęta osiągną wiek 8 tygodni. Badane zwierzęta należy scharakteryzować z uwzględnieniem ich gatunku, szczepu, źródła, płci, masy i wieku. W chwili rozpoczęcia badania odchylenia masy dla obu płci wykorzystanych zwierząt powinny być minimalne i nie może przekraczać \pm 20 % średniej masy wszystkich zwierząt wykorzystanych w ramach badania, osobno dla każdej płci. Należy losowo przydzielić zwierzęta do grup kontrolnych i grup poddawanych działaniu substancji badanej. Po randomizacji między grupami nie powinno być znaczących różnic w średniej wadze osobników w obrębie każdej płci. Jeśli odnotowano statystycznie istotne różnice, randomizację należy powtórzyć, jeśli jest to możliwe. Każdemu zwierzęciu należy przydzielić niepowtarzalny numer identyfikacyjny i w sposób stały oznaczyć je tym numerem poprzez jego wytatuowanie, wszczępienie implantu z chipem lub za pomocą innej odpowiedniej metody.

PROCEDURA**Liczba i płć zwierząt**

18. Należy wykorzystać zwierzęta obu płci. Należy wykorzystać wystarczającą liczbę zwierząt, tak aby na koniec badania w każdej grupie dostępnych było dostatecznie dużo zwierząt na potrzeby szczegółowych szacunków z punktu widzenia biologicznego i statystycznego. W przypadku gryzoni zazwyczaj należy w odniesieniu do każdego poziomu dawkowania wykorzystać co najmniej 20 zwierząt każdej płci i z każdej grupy, natomiast w przypadku gatunków innych niż gryzonie zaleca się wykorzystanie co najmniej 4 zwierząt każdej płci i z każdej grupy. W celu przeprowadzenia wszystkich wymaganych oznaczeń hematologicznych w przypadku badań z wykorzystaniem myszy może zaistnieć konieczność dodania zwierząt do każdej z grup otrzymujących dawki.

Założenia dotyczące uśmiercania w trakcie trwania doświadczenia, grup satelitarnych i zwierząt wskaźnikowych

19. W ramach badania można założyć uśmiercanie zwierząt w trakcie trwania doświadczenia (co najmniej 10 zwierząt każdej płci i z każdej grupy), np. po upływie 6 miesięcy, w celu uzyskania informacji na temat progresji zmian toksykologicznych oraz informacji dotyczących mechanizmu działania, jeśli jest to uzasadnione z naukowego punktu widzenia. Jeśli takie informacje są już dostępne dzięki poprzednim badaniom toksyczności wywołanej powtarzanym dawkowaniem badanej substancji chemicznej, uśmiercanie w trakcie trwania doświadczenia może nie być uzasadnione z naukowego punktu widzenia. W celu monitorowania odwracalności zmian

toksykologicznych wywołanych badaną substancją chemiczną można uwzględnić także grupy satelitarne. Wprowadzenie takich grup zazwyczaj będzie ograniczone do najwyższego poziomu dawki stosowanego w badaniu oraz grupy kontrolnej. W celu monitorowania w trakcie badania statusu choroby można w razie konieczności uwzględnić dodatkową grupę zwierząt wskaźnikowych (zazwyczaj 5 zwierząt każdej płci) (22). Jeśli planuje się uśmiercanie w trakcie trwania doświadczenia lub włączenie grup satelitarnych lub wskaźnikowych, liczbę zwierząt przewidzianą w projekcie badania należy zwiększyć o liczbę zwierząt przeznaczonych do uśmiercenia przed zakończeniem badania. Zwierzęta te zazwyczaj poddaje się takim samym obserwacjom, w tym obserwacjom dotyczącym masy ciała, spożycia pokarmu/wody, pomiarom hematologicznym i pod kątem biochemii klinicznej oraz pod kątem patologii, co zwierzęta wykorzystane w ramach głównego badania na etapie badania toksyczności przewlekłej, choć można założyć (w przypadku grup przewidzianych do uśmiercenia w trakcie trwania doświadczenia) ograniczenie takich pomiarów do konkretnych kluczowych wskaźników, takich jak badanie neurotoksyczności lub immunotoksyczności.

Grupy otrzymujące dawki oraz dawkowanie

20. Wytyczne dotyczące wszystkich aspektów doboru dawek oraz zróżnicowania poziomu dawek zawarto w wytycznych nr 116 (6). Należy zastosować co najmniej trzy poziomy dawek oraz ustanowić równoległą grupę kontrolną, poza przypadkiem, gdy prowadzone jest badanie graniczne (zob. pkt 27). Poziomy dawek będą zazwyczaj oparte na wynikach krótkoterminowych badań z powtarzanym dawkowaniem lub badań ustalających zakres dawkowania oraz należy uwzględnić w tym kontekście wszelkie istniejące dane toksykologiczne i toksykokinetyczne dostępne w odniesieniu do badanej substancji chemicznej lub substancji powiązanych.
21. O ile nie ogranicza tego fizykochemiczny charakter lub skutki biologiczne badanej substancji chemicznej, należy zwykle wybrać najwyższy poziom dawki w celu określenia głównych organów docelowych oraz skutków toksycznych, jednocześnie unikając cierpienia, toksyczności ostrej, chorobowości lub śmierci. Uwzględniając czynniki przedstawione w pkt 22 poniżej, należy wybrać najwyższy poziom dawki w celu uzyskania dowodów na toksyczność, potwierdzonych na przykład wolniejszym przybieraniem na wadze (o około 10 %).
22. W zależności od celów badania (zob. pkt 6) można wybrać najwyższą dawkę niższą od dawki potwierdzającej toksyczność, np. jeśli dawka powoduje szkodliwe zmiany istotne dla badania, które mają jednak niewielki wpływ na długość życia czy masę ciała. Górna dawka nie powinna przekroczyć 1 000 mg/kg masy ciała dziennie (dawka graniczna, zob. pkt 27).
23. Poziomy dawek i zróżnicowanie ich poziomów można dobrać tak, by określić odpowiedź zależną od dawki oraz NOAEL lub inny pożądaný wynik badania, np. BMD (zob. pkt 25) przy najniższym poziomie dawki. Przy stosowaniu niższych dawek należy rozważyć takie czynniki, jak: spodziewane nachylenie krzywej dawka-efekt, dawki, przy których mogą pojawić się istotne zmiany w metabolizmie, lub charakter działania toksycznego, przy którym oczekuje się wartości granicznej lub punktu wyjścia dla ekstrapolacji dla niskiej dawki.
24. Wybrane zróżnicowanie poziomów dawki będzie zależeć od właściwości badanej substancji chemicznej i nie może zostać z góry określone w niniejszej metodzie badawczej, jednak zastosowanie od podwójnych do poczwórnych odstępów pomiędzy kolejnym dawkowaniem często zapewnia dobre wyniki badania dla ustalenia malejących poziomów dawki, a dodanie czwartej grupy badanej jest często rozwiązaniem preferowanym w porównaniu ze stosowaniem bardzo dużych odstępów pomiędzy kolejnym dawkowaniem (np. pomnożonych przez współczynnik większy niż 6–10). Zasadniczo należy unikać stosowania współczynników większych niż 10, a w przypadku ich zastosowania należy je uzasadnić.
25. Jak opisano pokrótce w wytycznych OECD nr 116 (6), kwestie, jakie należy rozważyć przy doborze dawki, obejmują:
 - znane lub podejrzewane nieliniowości lub punkty przegięcia krzywej dawka-efekt,
 - toksykokinetykę oraz zakresy dawkowania, przy których występuje lub nie występuje indukcja metaboliczna, nasylenie lub też nieliniowość między dawką zewnętrzną a dawką wewnętrzną,
 - prekursorowe zmiany patologiczne, markery skutku lub wskaźniki działania kluczowych podstawowych procesów biologicznych,
 - kluczowe (lub podejrzewane) aspekty sposobu działania, takie jak dawki, przy których zaczyna pojawiać się cytotoxycytność, zakłócone zostają poziomy hormonów, przestają działać mechanizmy homeostatyczne itp.,
 - regiony krzywej dawka-efekt, gdzie konieczne są szczególnie solidne szacunki, np. w zakresie spodziewanej BMD lub podejrzewanej wartości granicznej,
 - uwzględnienie spodziewanych poziomów narażenia ludzi.
26. Grupa kontrolna powinna być grupą niepoddawaną działaniu substancji badanej lub grupą kontrolną nośnika, jeśli do podawania badanej substancji chemicznej zastosowano nośnik. Z wyjątkiem poddawania działaniu badanej substancji chemicznej zwierzęta z grupy kontrolnej należy traktować w taki sam sposób jak zwierzęta z grup badanych. Jeśli zastosowano nośnik, grupa kontrolna otrzymuje nośnik w najwyższej objętości stosowanej wśród grup otrzymujących dawki. Jeśli badaną substancję chemiczną podaje się wraz z pokarmem i jeśli powoduje ona znacznie zmniejszone spożycie pokarmu z powodu jego obniżonych walorów smakowych, pomocna może być dodatkowa grupa kontrolna zwierząt otrzymujących pokarm w ilości spożywanej przez zwierzęta z grupy badanej (pair-fed), która zapewni odpowiedniejszą kontrolę.

27. Pełne badanie z zastosowaniem trzech poziomów dawek może zostać uznane za zbędne, jeśli na podstawie informacji pochodzących z badań wstępnych możliwe jest założenie, że badanie z zastosowaniem jednego poziomu dawki, równego co najmniej 1 000 mg/kg masy ciała dziennie, przeprowadzone z zastosowaniem procedur opisanych w odniesieniu do tego badania, nie spowoduje szkodliwych zmian, oraz jeśli na podstawie danych dotyczących innych strukturalnie powiązanych związków nie przewiduje się toksyczności. Można zastosować limit 1 000 mg/kg masy ciała dziennie, z wyjątkiem sytuacji, gdy narażenie ludzi wskazuje potrzebę zastosowania wyższego poziomu dawki.

Przygotowanie dawek i podanie badanej substancji chemicznej

28. Badaną substancję chemiczną zazwyczaj podaje się drogą pokarmową, wraz z pokarmem lub wodą pitną, lub też za pomocą sondy. Dodatkowe informacje na temat dróg i metod podania przedstawiono w wytycznych nr 116 (6). Droga i metoda podania zależą od celu badania, fizykochemicznych właściwości badanej substancji chemicznej, jej biodostępności oraz głównej drogi i metody narażenia ludzi. Należy przedstawić uzasadnienie wybranej drogi i metody podania. W trosce o dobrostan zwierząt karmienie za pomocą sondy należy wybierać wyłącznie w przypadku tych substancji, dla których taka droga i metoda podania w sposób uzasadniony odzwierciedlają potencjalne narażenie ludzi (np. produktów farmaceutycznych). Substancje występujące w pokarmie lub środowisku naturalnym, w tym pestycydy, podaje się zazwyczaj wraz z pokarmem lub wodą pitną.
W przypadku jednak niektórych scenariuszy, np. narażenia zawodowego, podawanie substancji za pomocą innych dróg może być bardziej właściwe.
29. W razie potrzeby badaną substancję chemiczną rozpuszcza się lub sporządza się jej zawiesinę w odpowiednim nośniku. W stosownych przypadkach należy wziąć pod uwagę następujące cechy nośnika i innych dodatków: wpływ na wchłanianie, dystrybucję, metabolizm oraz zatrzymywanie badanej substancji chemicznej; wpływ na chemiczne własności badanej substancji chemicznej, które mogą zmieniać jej charakterystykę toksyczną; oraz wpływ na spożycie pokarmu lub wody lub też na stan odżywienia zwierząt. Zaleca się, w miarę możliwości, najpierw rozważyć zastosowanie wodnego roztworu/zawiesiny, następnie roztworu/emulsji woda-olej (np. z zastosowaniem oleju kukurydzianego), a potem możliwego roztworu w innych nośnikach. W przypadku nośników innych niż woda charakterystyka toksyczna nośnika powinna być znana. Dostępne powinny być także informacje na temat stabilności badanej substancji chemicznej oraz jednorodności roztworów dawek lub pokarmu z dawkami (w stosownych przypadkach) w warunkach podawania (np. pokarmu).
30. W przypadku substancji podawanych w pokarmie lub wodzie pitnej ważne jest dopilnowanie, by takie ilości badanej substancji chemicznej nie zakłócały normalnego odżywiania ani bilansu wodnego organizmu. W przypadku długoterminowych badań toksyczności z zastosowaniem podawania dawek wraz z pokarmem stężenie badanej substancji chemicznej w paszy nie powinno w normalnych warunkach przekraczać górnej granicy 5 % całego pokarmu, aby uniknąć nierównowagi żywieniowej. Przy podawaniu badanej substancji chemicznej wraz z pokarmem można zastosować stałe stężenie w pokarmie (mg/kg pokarmu lub ppm) lub też stały poziom dawki w odniesieniu do masy ciała zwierzęcia (mg/kg masy ciała), obliczany cotygodniowo. Należy określić, które rozwiązanie zastosowano.
31. Przy podawaniu substancji drogą pokarmową zwierzętom podaje się dawki badanej substancji chemicznej codziennie (siedem dni w tygodniu), zazwyczaj przez okres 12 miesięcy (zob. także pkt 33), chociaż w zależności od wymogów regulacyjnych konieczny może być dłuższy okres podawania danej substancji. Zastosowanie innego schematu dawkowania, np. przez pięć dni w tygodniu, należy uzasadnić. Przy podawaniu substancji drogą dermalną zwierzęta zazwyczaj poddaje się działaniu badanej substancji chemicznej przez co najmniej 6 godzin dziennie, 7 dni w tygodniu, zgodnie z rozdziałem B.9 niniejszego załącznika (10), przez okres 12 miesięcy. Narażenie drogą inhalacyjną stosuje się przez 6 godzin dziennie, 7 dni w tygodniu, ale możliwe jest zastosowanie narażenia także przez 5 dni w tygodniu, jeśli zostanie to uzasadnione. Okres narażenia zazwyczaj wynosi 12 miesięcy. Jeśli gatunki gryzoni inne niż szczury poddaje się narażeniu wyłącznie poprzez nos, maksymalne okresy narażenia można dostosować tak, by zminimalizować charakterystyczny dla danego gatunku stres. W przypadku stosowania okresu narażenia krótszego niż 6 godzin dziennie należy przedstawić stosowne uzasadnienie. Zobacz również rozdział B.8 niniejszego załącznika (8).
32. Jeśli badaną substancję chemiczną podaje się zwierzętom za pomocą sondy, należy dokonywać tego z użyciem sondy żołądkowej lub odpowiedniej kaniuli intubacyjnej każdego dnia o podobnych porach. Zazwyczaj podaje się pojedynczą dawkę raz dziennie, jeśli jednak substancja jest na przykład substancją wykazującą miejscowe działanie drażniące, możliwe jest zachowanie dziennej mocy dawki poprzez podawanie jej jako dawki dzielonej (dwa razy dziennie). Maksymalna objętość cieczy, jaką można podać jednorazowo, zależy od wielkości badanego zwierzęcia. Objętość taka powinna być możliwie jak najniższa i nie powinna w normalnych warunkach przekraczać 1 ml/100 g masy ciała w przypadku gryzoni (22). Zmienność stosowanej objętości należy zminimalizować poprzez dostosowanie stężenia, aby zapewnić stałą objętość przy wszystkich poziomach dawek. Wyjątkiem są substancje potencjalnie żrące lub wykazujące działanie drażniące, które należy rozcieńczyć w celu uniknięcia miejscowych ostrych skutków. Należy unikać badania z użyciem stężeń, które mogą mieć działanie żrące lub drażniące na przewód pokarmowy.

Czas trwania badania

33. Mimo że niniejsza metoda badawcza jest przede wszystkim zaprojektowana jako 12-miesięczne badanie toksyczności przewlekłej, w ramach projektu badania można zaplanować i zastosować krótszy (wynoszący np. 6 lub 9 miesięcy) lub dłuższy (wynoszący np. 18 miesięcy lub 24 miesiące) czas trwania badania w zależności od wymogów poszczególnych systemów regulacyjnych lub w przypadku specyficznych celów modeli mechanistycznych. Odstępstwa od 12-miesięcznego czasu trwania narażenia należy uzasadnić, zwłaszcza w przypadku krótszych okresów. Grupy satelitarne wprowadzone w celu monitorowania odwrotności zmian toksykologicznych wywołanych przez badaną substancję chemiczną należy utrzymać bez podawania danej substancji przez okres nie krótszy niż 4 tygodnie oraz nie dłuższy niż jedna trzecia całego okresu trwania badania po ustaniu narażenia. Dalsze wytyczne, w tym dotyczące sposobu uwzględnienia zwierząt, które przeżyły badanie, przedstawiono w wytycznych nr 116 (6).

OBSERWACJE

34. Wszystkie zwierzęta należy sprawdzić pod kątem chorobowości i upadkowości, zazwyczaj na początku i pod koniec każdego dnia, włącznie z weekendami i dniami wolnymi od pracy. Ogólnych obserwacji klinicznych należy dokonywać co najmniej raz dziennie, najlepiej o tej samej porze lub porach każdego dnia, uwzględniając szczytowy okres przewidywanych skutków po podaniu dawki w przypadku podawania substancji badanej za pomocą sondy.
35. Przynajmniej raz przed pierwszym narażeniem należy dokonać szczegółowej obserwacji klinicznej wszystkich zwierząt (w celu umożliwienia porównań dotyczących tych samych osobników), a także pod koniec pierwszego tygodnia badania, a po tym okresie – co miesiąc. Protokół dotyczący obserwacji należy opracować tak, by zminimalizować odchylenia między poszczególnymi obserwatorami i by były one niezależne od badanej grupy. Obserwacji należy dokonywać poza klatką zwierzęcia, najlepiej w warunkach standardowych i za każdym razem o podobnych porach. Obserwacje należy starannie odnotować, najlepiej za pomocą systemów punktacji wyraźnie określonych przez laboratorium badawcze. Należy dołożyć starań w celu dopilnowania, aby odchylenia w warunkach obserwacji były minimalne. Odnotowane objawy powinny obejmować między innymi zmiany na skórze, sierści, oczach, błonach śluzowych, wystąpienie wydzielin i wydalin oraz aktywność autonomicznej części układu nerwowego (np. łzawienie, piloerekcję, rozmiar źrenicy, nietypowy rytm oddychania). Należy odnotować także zmiany w sposobie chodzenia, postawie i reakcji na dotyk, jak również obecność ruchów klonicznych lub tonicznych, zachowań stereotypowych (np. nadmierne czyszczenie się, powtarzające się krążenie w kółko) oraz dziwne zachowania (np. samookaleczanie się, chodzenie do tyłu) (24).
36. Badanie oftalmologiczne, za pomocą oftalmoskopu lub innego odpowiedniego sprzętu, należy przeprowadzić u wszystkich zwierząt przed pierwszym podaniem badanej substancji chemicznej. Badanie to należy przeprowadzić także wraz z zakończeniem badania, najlepiej u wszystkich zwierząt, a co najmniej w grupach otrzymujących wysokie dawki i w grupach kontrolnych. W przypadku wykrycia w oczach zmian związanych z poddawaniem zwierząt działaniu substancji badanej należy przebadać wszystkie zwierzęta. Jeśli wyniki analizy strukturalnej lub inne informacje wskazują na toksyczność dla oczu, należy zwiększyć częstotliwość badania oczu.
37. W przypadku substancji chemicznych, dla których poprzednie 28-dniowe lub 90-dniowe badania toksyczności wywołanej powtarzanym dawkowaniem wykazały prawdopodobieństwo wywoływania działania neurotoksycznego, przed rozpoczęciem badania oraz co 3 miesiące po rozpoczęciu badania przez okres do 12 miesięcy, a także na zakończenie badania (jeśli jego czas trwania jest dłuższy niż 12 miesięcy) można przeprowadzić ocenę reaktywności na różnego typu bodźce (24) (np. bodźce słuchowe, wizualne i proprioceptywne) (25) (26) (27), siły uchwytu (28) oraz ocenę aktywności motorycznej (29). Dalsze szczegółowe informacje na temat procedur, jakie można zastosować, podano w odpowiednich źródłach. Można jednak zastosować również procedury inne niż te podane w bibliografii.
38. W przypadku substancji chemicznych, dla których poprzednie 28-dniowe lub 90-dniowe badania toksyczności wywołanej powtarzanym dawkowaniem wykazały prawdopodobieństwo wywoływania działania immunotoksycznego, dalsze badania tego punktu końcowego można przeprowadzić wraz z zakończeniem badania.

Masa ciała, spożycie pokarmu/wody i wydajność pokarmu

39. Wszystkie zwierzęta należy zważyć na początku rozpoczęcia poddawania ich działaniu substancji badanej, a także co najmniej raz w tygodniu przez pierwsze 13 tygodni, a po tym okresie – co najmniej raz w miesiącu. Pomiarów spożycia pokarmu i wydajności pokarmu należy dokonywać co najmniej raz w tygodniu przez pierwsze 13 tygodni, a po tym okresie – co najmniej raz w miesiącu. Spożycie wody należy mierzyć co najmniej raz w tygodniu przez pierwsze 13 tygodni, a po tym okresie – co najmniej raz w miesiącu, jeśli substancję badaną podaje się w wodzie pitnej. Pomiaru spożycia wody należy rozważyć także w przypadku badań, w których zachodzą zmiany związane ze spożyciem wody.

Hematologia i biochemia kliniczna

40. W przypadku badań z wykorzystaniem gryzoni badania hematologiczne należy przeprowadzać u co najmniej 10 samców i 10 samic w każdej grupie po upływie 3, 6 i 12 miesięcy, a także wraz z zakończeniem badania (jeśli jego czas trwania jest dłuższy niż 12 miesięcy), wykorzystując w tym celu te same osobniki przez cały okres badania. W przypadku wykorzystania w badaniu myszy konieczne może być wprowadzenie zwierząt satelitarnych w celu przeprowadzenia wszystkich wymaganych oznaczeń hematologicznych (zob. pkt 18). W badaniach z wykorzystaniem gatunków innych niż gryzonie próbki należy pobierać od mniejszej liczby zwierząt (np. od 4 zwierząt dla każdej płci i grupy w badaniach z wykorzystaniem psów) w trakcie badania oraz wraz z jego zakończeniem, tak jak opisano w odniesieniu do badań z wykorzystaniem gryzoni. Nie ma konieczności przeprowadzania pomiarów po upływie 3 miesięcy – zarówno w przypadku gryzoni, jak i gatunków innych niż gryzonie – jeśli w poprzednim 90-dniowym badaniu przeprowadzonym przy porównywalnych poziomach dawek nie odnotowano zmian parametrów hematologicznych. Próbkę krwi należy pobrać z określonego miejsca, na przykład poprzez nakłucie serca lub z zatoki oczodołowej tylnej, w znieczuleniu.
41. Należy zbadać następujące parametry (30): całkowitą i różnicową liczbę leukocytów, liczbę czerwonych krwinek, liczbę płytek krwi, stężenie hemoglobiny, hematokryt (HCT), średnią objętość krwinki czerwonej (MCV), średnią masę hemoglobiny w krwince czerwonej (MCH), średnie stężenie hemoglobiny w krwince czerwonej (MCHC), czas protrombinowy oraz czas częściowej tromboplastyny po aktywacji. W stosownych przypadkach można zmierzyć inne parametry hematologiczne, takie jak całka Heinza lub inne nietypowe parametry morfologii erytrocytów lub methemoglobiny, w zależności od toksyczności badanej substancji chemicznej. Zasadniczo należy przyjąć elastyczne podejście, dostosowane do obserwowanych lub spodziewanych skutków danej badanej substancji chemicznej. Jeśli badana substancja chemiczna ma wpływ na układ krwiotwórczy, można również przeprowadzić badanie liczby retikulocytów i cytologię szpiku kostnego, choć nie trzeba przeprowadzać takich badań rutynowo.

42. Oznaczenia parametrów biochemii klinicznej w celu zbadania głównych skutków toksycznych w tkankach, a w szczególności skutków dla nerek i wątroby, należy wykonać na próbkach krwi pobranych od co najmniej 10 samców i 10 samic z każdej grupy w takich samych odstępach czasowych jak w przypadku badań hematologicznych, wykorzystując w tym celu te same osobniki przez cały okres badania. W przypadku wykorzystania w badaniu myszy konieczne może być wprowadzenie zwierząt satelitarnych w celu przeprowadzenia wszystkich wymaganych oznaczeń parametrów biochemii klinicznej. W badaniach z wykorzystaniem gatunków innych niż gryzoni próbki należy pobierać od mniejszej liczby zwierząt (np. od 4 zwierząt dla każdej płci i grupy w badaniach z wykorzystaniem psów) w trakcie badania oraz wraz z jego zakończeniem, tak jak opisano w odniesieniu do badań z wykorzystaniem gryzoni. Nie ma konieczności przeprowadzania pomiarów po upływie 3 miesięcy, zarówno w przypadku gryzoni, jak i gatunków innych niż gryzoni, jeśli w poprzednim 90-dniowym badaniu przeprowadzonym przy porównywalnych poziomach dawek nie odnotowano zmian parametrów biochemii klinicznej. Zalecane jest wstrzymanie podawania zwierzętom pokarmu (z wyjątkiem myszy) przez noc poprzedzającą pobranie krwi. Należy zbadać następujące parametry (30): glukoza, mocznik (azot mocznikowy), kreatynina, białko całkowite, albumina, wapń, sód, potas, cholesterol całkowity, co najmniej dwa odpowiednie badania w celu oceny komórek wątroby (aminotransferaza alaninowa, aminotransferaza asparaginianowa, dehydrogenaza glutaminianowa, kwasy żółciowe całkowite) (31), oraz co najmniej dwa odpowiednie badania w celu oceny wątroby i dróg żółciowych (fosfataza alkaliczna, gamma-glutamylotranspeptydaza, 5'-nukleotydaza, bilirubina całkowita, kwasy żółciowe całkowite) (31). W stosownych przypadkach można zbadać inne parametry biochemii klinicznej, takie jak: stężenie trójglicerydów na czczo, poziom określonych hormonów oraz poziom pseudocholinesterazy, w zależności od toksyczności badanej substancji chemicznej. Ogólnie rzecz biorąc, należy przyjąć elastyczne podejście w zależności od gatunku oraz obserwowanych lub spodziewanych skutków danej badanej substancji chemicznej.
43. Oznaczenia w ramach analizy moczu należy przeprowadzić u co najmniej 10 samców i 10 samic z każdej grupy na próbkach pobranych w takich samych odstępach czasu jak w przypadku hematologii i biochemii klinicznej. Nie ma konieczności przeprowadzania pomiarów po upływie 3 miesięcy, jeśli w poprzednim 90-dniowym badaniu przeprowadzonym przy porównywalnych poziomach dawek nie odnotowano zmian w analizie moczu. Zalecenie ekspertów dotyczące badań klinicznych pod kątem patologii obejmuje następujące parametry (30): wygląd, objętość, osmolalność lub ciężar właściwy, pH, białko całkowite i glukoza. Inne oznaczenia obejmują ketony, urobilinogen, bilirubinę i krew utajoną. W stosownych przypadkach można zastosować badania dodatkowych parametrów w celu rozszerzenia badania zaobserwowanych skutków.
44. Ogólnie uznaje się, że podstawowe zmienne hematologiczne i biochemii klinicznej należy zbadać przed poddaniem zwierząt działaniu substancji badanej w przypadku badań z wykorzystaniem psów, jednak nie ma takiej potrzeby w przypadku badań z wykorzystaniem gryzoni (30). Jeśli jednak historyczne dane podstawowe (zob. pkt 50) są nieodpowiednie, należy rozważyć wygenerowanie takich danych.

Patologia

Pełne rozpoznanie histopatologiczne

45. Wszystkie zwierzęta wykorzystane w badaniu należy zazwyczaj poddać pełnemu, szczegółowemu rozpoznaniu histopatologicznemu, które obejmuje staranne zbadanie zewnętrznej powierzchni ciała, wszystkich otworów, jamy czaszki, jamy klatki piersiowej i jamy brzusznej oraz ich zawartości. Można jednak założyć (w grupach przewidzianych do uśmiercenia w trakcie trwania doświadczenia lub w grupach satelitarnych) ograniczenie pomiarów do poszczególnych kluczowych wskaźników, takich jak badanie neurotoksyczności lub immunotoksyczności (zob. pkt 19). Takie zwierzęta nie muszą zostać poddane sekcji zwłok ani dalszym procedurom opisanym w poniższych punktach. Zwierzęta wskaźnikowe mogą w poszczególnych przypadkach wymagać sekcji zwłok, według uznania kierownika badania.
46. Należy odnotować masy organów wszystkich zwierząt, prócz tych wyłączonych na mocy ostatniej części pkt 45. Nadnercza, mózg, nąjdrza, serce, nerki, wątrobę, jajniki, śledzionę, jądra, tarczycę (zważoną po utrwaleniu, z przytarczycami) oraz macicę pobrane od wszystkich zwierząt (oprócz tych znalezionych w stanie agonialnym lub uśmierconych w trakcie trwania doświadczenia) należy w stosownych przypadkach okroić z wszelkich przylegających tkanek i zmierzyć ich masę mokrą możliwie jak najszybciej po sekcji w celu zapobiegnięcia ich wyschnięciu. W badaniu z wykorzystaniem myszy ważenie nadnerczy jest opcjonalne.
47. Następujące tkanki należy zachować w roztworze utrwalającym najbardziej odpowiednim zarówno dla rodzaju tkanki, jak i planowanego późniejszego badania histopatologicznego (32) (tkanki podane w nawiasach kwadratowych są opcjonalne):

| | | | |
|--|----------------------------|---------------|--|
| wszystkie makroskopowe zmiany patologiczne | serce | trzustka | żołądek (przedżołądek, żołądek gruczołowy) |
| nadnercze | jelito kręte | przytarczyca | [zęby] |
| aorta | jelito czcze | nerw obwodowy | jądro |
| mózg (w tym części kresomózgowia, mózdzku i rdzenia/mostu) | nerka | przysadka | grasica |
| jelito ślepe | gruczoł łzowy (oczodołowy) | prostata | tarczycyca |
| szyjka macicy | wątroba | odbytnica | [język] |

| | | | |
|---|--|---|--|
| gruczoł koagulujący | płuco | gruczoł ślinowy | tchawica |
| okreźnica | węzły chłonne (powierzchnowe i głębokie) | pęcherzyk nasienny | pęcherz moczowy |
| dwunastnica | gruczoł mlekowy (obowiązkowo w przypadku samic oraz, jeśli wyraźnie nadaje się do analizy, również w przypadku samców) | mięsień szkieletowy | macica (w tym szyjka macicy) |
| najądrze | [górne drogi oddechowe, w tym nos, małżowiny nosowe oraz zatoki przynosowe] | skóra | [moczowód] |
| oko (w tym siatkówka) | przełyk | rdzeń kręgowy (na trzech odcinkach: szyjnym, śródpiersiowym i lędźwiowym) | [cewka moczowa] |
| [kość udowa ze stawem] | [opuszka węchowa] | śledziona | pochwa |
| pęcherzyk żółciowy (w przypadku gatunków innych niż szczur) | jajnik | [mostek] | wycinek szpiku kostnego lub świeży aspirat szpiku kostnego |
| gruczoł przyoczny | | | |

W przypadku organów parzystych, np. nerek lub nadnerczy, należy utrwalić oba organy. Wyniki badań klinicznych i innych testów mogą wskazać na konieczność zbadania dodatkowych tkanek. Organy uznane w oparciu o znane właściwości badanej substancji chemicznej za prawdopodobne organy docelowe także należy zachować. W przypadku badań z zastosowaniem dermalnej drogi podania należy utrwalić organy zgodnie z listą określoną dla podania drogą pokarmową, przy czym kluczowe jest pobranie i zachowanie próbek skóry z miejsca aplikacji. W przypadku badań z zastosowaniem inhalacyjnej drogi podania, układając listę tkanek z dróg oddechowych do zachowania i zbadania, należy kierować się zaleceniami zawartymi w rozdziale B.8 niniejszego załącznika (8) i rozdziale B.29 niniejszego załącznika (9). W przypadku innych organów/tkanek (oraz oprócz określonych utwalonych tkanek z dróg oddechowych) należy zbadać organy zgodnie z listą określoną dla podania drogą pokarmową.

Histopatologia

48. Dostępne są wytyczne dotyczące najlepszych praktyk związanych z przeprowadzaniem toksykologicznych badań zmian patologicznych (32). Badaniu histopatologicznemu należy poddać co najmniej następujące tkanki:

- wszystkie tkanki zwierząt z grup otrzymujących wysokie dawki i z grup kontrolnych,
- wszystkie tkanki zwierząt padłych lub uśmierconych podczas badania,
- wszystkie tkanki wykazujące makroskopowe nieprawidłowości,
- tkanki docelowe lub tkanki, które wykazują zmiany spowodowane poddaniem zwierzęcia działaniu substancji badanej w grupie otrzymującej wysokie dawki, pobrane od wszystkich zwierząt we wszystkich innych grupach otrzymujących dawki,
- w przypadku organów parzystych, np. nerek lub nadnerczy, należy zbadać oba organy.

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Dane

49. W odniesieniu do wszystkich parametrów poddawanych oszacowaniu należy przedstawić dane dotyczące każdego zwierzęcia. Dodatkowo wszystkie dane należy zestawić w postaci tabeli, przedstawiając w odniesieniu do każdej badanej grupy liczbę zwierząt na początku badania, liczbę zwierząt padłych w trakcie trwania badania lub uśmierconych z przyczyn humanitarnych, wraz z określeniem czasu zgonu lub humanitarnego uśmiercenia, liczbę zwierząt wykazujących objawy toksyczności, opis obserwowanych objawów toksyczności, w tym czas ich pojawienia się, czas trwania, stopień ostrości wszelkich skutków toksycznych, liczbę zwierząt wykazujących zmiany patologiczne, typ takich zmian oraz procent zwierząt wykazujących każdy typ zmiany. W tabelach z zestawieniem danych należy oprócz klasyfikacji zmian patologicznych przedstawić średnie i standardowe odchylenia (dla danych z badań ciągłych) dotyczące zwierząt wykazujących skutki toksyczne lub zmiany patologiczne.

50. Historyczne dane kontrolne mogą być cenne przy interpretacji wyników badania, np. jeśli istnieją przesłanki, że dane uzyskane z równoczesnych kontroli są w sposób znaczący niestandardowe w porównaniu z najnowszymi danymi dotyczącymi zwierząt kontrolnych z tej samej placówki przeprowadzającej badanie/badanej kolonii. Historyczne dane kontrolne, jeśli poddaje się je oszacowaniu, powinno przedstawić to samo laboratorium i powinny się one odnosić do zwierząt w tym samym wieku i z tego samego szczepu. Dane takie powinny zostać wygenerowane w ciągu pięciu lat przed rozpoczęciem rozważanego badania.
51. W stosownych przypadkach wyniki liczbowe należy poddawać oszacowaniu za pomocą właściwych i ogólnie przyjętych metod statystycznych. Metody statystyczne i dane poddawane analizie należy wybrać w czasie przygotowywania projektu badania (pkt 8). Taki wybór powinien obejmować w razie konieczności korektę uwzględniającą zwierzęta, które przeżyły.

Sprawozdanie z badania

52. Sprawozdanie z badania powinno zawierać następujące informacje:

Badana substancja chemiczna

- cechy fizyczne, czystość i własności fizykochemiczne,
- dane identyfikacyjne,
- źródło substancji chemicznej,
- numer partii,
- świadectwo analizy chemicznej.

Nośnik (w stosownych przypadkach)

- uzasadnienie wyboru nośnika (jeżeli jest inny niż woda).

Badane zwierzęta

- wykorzystany gatunek/szczep oraz uzasadnienie takiego wyboru,
- liczba, wiek i płeć zwierząt na początku badania,
- źródło, warunki przetrzymywania, pokarm itp.,
- masa ciała poszczególnych zwierząt na początku badania.

Warunki badania

- uzasadnienie drogi podania i doboru dawek,
- w stosownych przypadkach metody statystyczne zastosowane do analizy danych,
- szczegółowe informacje na temat postaci użytkowej badanej substancji chemicznej/przygotowywania pokarmu,
- dane analityczne dotyczące osiąganego stężenia, stabilności i jednorodności preparatu,
- droga podania i szczegółowe dane dotyczące podawania badanej substancji chemicznej,
- w przypadku badań inhalacyjnych informacje o tym, czy narażenie odbywa się wyłącznie przez nos czy przez całe ciało,
- dawki rzeczywiste (mg/kg masy ciała/dzień) oraz w stosownych przypadkach wskaźnik konwersji stężenia badanej substancji chemicznej w pokarmie/wodzie pitnej (mg/kg lub ppm) do dawki rzeczywistej,
- szczegółowe informacje o pokarmie i jakości wody.

Wyniki (należy przedstawić zestawienie danych w tabeli oraz dane dotyczące poszczególnych zwierząt)

- dane dotyczące zwierząt, które przeżyły,
- masa ciała/zmiany masy ciała,
- dane dotyczące spożycia pokarmu, wyliczenia wydajności pokarmu, jeśli przeprowadzono, oraz w stosownych przypadkach dane dotyczące spożycia wody,
- dane dotyczące efektu toksycznego według płci i poziomu dawki, włączając objawy toksyczności,
- rodzaj, występowanie (i ostrość, jeśli poddano ją ocenie) oraz czas trwania obserwowanych objawów klinicznych (tak odwracalnych, jak i nieodwracalnych),
- wyniki badania oftalmologicznego,
- wyniki badania hematologicznego,
- wyniki klinicznych badań biochemicznych,
- wyniki analizy moczu,
- wynik wszelkich badań neurotoksyczności lub immunotoksyczności,
- masa ciała w chwili zgonu,
- masa organów (i w stosownych przypadkach ich współczynniki),
- wyniki sekcji zwłok,
- szczegółowy opis wszystkich wyników badań histopatologicznych związanych z poddawaniem zwierząt działaniu substancji badanej,
- dane dotyczące wchłaniania, jeśli są dostępne.

W stosownych przypadkach statystyczne opracowanie wyników

Omówienie wyników, w tym:

- zależność dawka-odpowiedź,
- rozważenie wszelkich informacji na temat sposobu działania,
- omówienie wszelkich podejść modelowych,
- określenie BMD, NOAEL lub LOAEL,
- historyczne dane kontrolne,
- znaczenie dla ludzi.

Wnioski

BIBLIOGRAFIA:

- (1) OECD (1995). Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing (Rzym, 1995), wewnętrzny dokument roboczy, Dyrekcja ds. Środowiska, OECD, Paryż.
- (2) Combes RD, Gaunt I, Balls M (2004). A Scientific and Animal Welfare Assessment of the OECD Health Effects Test Guidelines for the Safety Testing of Chemicals under the European Union REACH System. ATLA 32: 163–208.

- (3) Barlow SM, Greig JB, Bridges JW i in. (2002). Hazard identification by methods of animal-based toxicology. *Food. Chem. Toxicol.* 40, 145–191.
- (4) Chhabra RS, Bucher JR, Wolfe M, Portier C (2003). Toxicity characterization of environmental chemicals by the US National Toxicology Programme: an overview. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 206: 437–445.
- (5) Rozdział B.27 niniejszego załącznika, Badanie toksyczności podprzewlekłej drogą pokarmową – badania toksyczności drogą pokarmową na gatunkach innych niż gryzonie metodą powtarzanej 90-dniowej dawki.
- (6) OECD (2012). Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 and 453 – wyd. drugie. Series on Testing and Assessment nr 116, dostępne na publicznej stronie OECD poświęconej wytycznym dotyczącym badań: www.oecd.org/env/testguidelines.
- (7) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Series on Testing and Assessment nr 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paryż.
- (8) Rozdział B.8 niniejszego załącznika. Toksyczność powtarzanej (28 dni) dawki (inhalacyjna).
- (9) Rozdział B.29 niniejszego załącznika. Badanie podprzewlekłej toksyczności inhalacyjnej – 90-dniowe badania inhalacyjne z wykorzystaniem gatunków gryzoni.
- (10) Rozdział B.9 niniejszego załącznika, Toksyczność powtarzanej (28 dni) dawki (dermalna).
- (11) Carmichael NG, Barton HA, Boobis AR i in. (2006). Agricultural Chemical Safety Assessment: A Multisector Approach to the Modernization of Human Safety Requirements. *Critical Reviews in Toxicology* 36: 1–7.
- (12) Barton HA, Pastoor TP, Baetcke T i in. (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments. *Critical Reviews in Toxicology* 36: 9–35.
- (13) Doe JE, Boobis AR, Blacker A i in. (2006). A Tiered Approach to Systemic Toxicity Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. *Critical Reviews in Toxicology* 36: 37–68.
- (14) Cooper RL, Lamb JS, Barlow SM i in. (2006). A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. *Critical Reviews in Toxicology* 36: 69–98.
- (15) OECD (2002). Guidance Notes for Analysis and Evaluation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Series on Testing and Assessment nr 35 oraz Series on Pesticides nr 14, ENV/JM/MONO(2002)19, OECD, Paryż.
- (16) OECD (2000). Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation, nr 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paryż.
- (17) Rhomberg LR, Baetcke K, Blancato J, Bus J, Cohen S, Conolly R, Dixit R, Doe J, Ekelman K, Fenner-Crisp P, Harvey P, Hattis D, Jacobs A, Jacobson-Kram D, Lewandowski T, Liteplo R, Pelkonen O, Rice J, Somers D, Turturro A, West W, Olin S (2007). Issues in the Design and Interpretation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies in Rodents: Approaches to Dose Selection *Crit Rev. Toxicol.* 37 (9): 729–837.
- (18) ILSI (Międzynarodowy Instytut Nauk Biologicznych) (1997). Principles for the Selection of Doses in Chronic Rodent Bioassays. Foran JA (red.). ILSI Press, Waszyngton, D.C.
- (19) Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady 2010/63/UE z dnia 22 września 2010 r. w sprawie ochrony zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych (Dz.U. L 276 z 20.10.2010, s. 33).
- (20) National Research Council, 1985. Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication nr 86-23. Waszyngton D.C., Departament Zdrowia i Opieki Społecznej Stanów Zjednoczonych.
- (21) GV-SOLAS (Towarzystwo Nauk o Zwierzętach Laboratoryjnych, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 1988). Publication on the Planning and Structure of Animal Facilities for Institutes Performing Animal Experiments. ISBN 3-906255-04-2.

-
- (22) GV-SOLAS (Towarzystwo Nauk o Zwierzętach Laboratoryjnych, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 2006). Microbiological monitoring of laboratory animals in various housing systems.
 - (23) Diehl K-H, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, Vidal J-M, van de Vorstenbosch C. 2001. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. *Journal of Applied Toxicology* 21: 15–23.
 - (24) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document nr 60.
 - (25) Tupper DE, Wallace RB (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. *Acta Neurobiol. Exp.* 40: 999–1003.
 - (26) Gad SC (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. *J. Toxicol. Environ. Health* 9: 691–704.
 - (27) Moser VC, McDaniel KM, Phillips PM (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 108: 267–283.
 - (28) Meyer OA, Tilson HA, Byrd WC, Riley MT (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hind-limb Grip Strength of Rats and Mice. *Neurobehav. Toxicol.* 1: 233–236.
 - (29) Crofton KM, Howard JL, Moser VC, Gill MW, Reiter LW, Tilson HA, MacPhail RC (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. *Neurotoxicol. Teratol.* 13: 599–609.
 - (30) Weingand K, Brown G, Hall R i in. (1996). Harmonisation of Animal Clinical Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies. *Fundam. & Appl. Toxicol.* 29: 198–201.
 - (31) EMEA, projekt dokumentu pt. »Non-clinical guideline on drug-induced hepatotoxicity« (nr ref. EMEA/CHMP/SWP/a50115/2006).
 - (32) Crissman JW, Goodman DG, Hildebrandt PK i in. (2004). Best Practices Guideline: Toxicological Histopathology. *Toxicologic Pathology* 32: 126–131.
-

Dodatek 1

DEFINICJA

Badana substancja chemiczna: jakakolwiek substancja lub mieszanina badana za pomocą niniejszej metody badawczej.”

6) rozdziały B.32 i B.33 otrzymują brzmienie:

„B.32. **BADANIA RAKOTWÓRCZOŚCI**

WPROWADZENIE

1. Niniejsza metoda badawcza jest równoważna z dotyczącą badań wytyczną OECD nr 451 (2009). Pierwotny tekst TG 451 dotyczącej badań rakotwórczości przyjęto w 1981 r. Opracowanie niniejszej zmienionej metody badawczej B.32 uznano za konieczne w celu odzwierciedlenia ostatnich zmian w dziedzinie dobrostanu zwierząt i wymogów regulacyjnych (2) (3) (4) (5) (6). Aktualizację niniejszej metody badawczej B.32 przeprowadzono równoległe z modyfikacjami rozdziału B.30 niniejszego załącznika, dotyczącego badań toksyczności przewlekłej, oraz rozdziału B.33 niniejszego załącznika, dotyczącego łączonych badań toksyczności przewlekłej/rakotwórczości, w celu uzyskania dodatkowych informacji pochodzących od zwierząt wykorzystywanych w badaniu oraz zapewnienia dalszych szczegółowych informacji na temat doboru dawek. Niniejszą metodę badawczą B.32 opracowano w celu jej wykorzystywania w badaniach szerokiego zakresu chemikaliów, w tym pestycydów i chemikaliów przemysłowych. Należy zauważyć jednak, że niektóre dane szczegółowe i wymogi mogą różnić się w przypadku produktów farmaceutycznych (zob. wytyczne S1B dotyczące badania produktów farmaceutycznych pod kątem rakotwórczości Międzynarodowej Konferencji ds. Harmonizacji (ICH)).
2. Większość badań rakotwórczości przeprowadza się z wykorzystaniem gatunków gryzoni, w związku z czym niniejsza metoda badawcza przewidziana jest do stosowania przede wszystkim w badaniach z wykorzystaniem takich gatunków. W przypadku konieczności przeprowadzenia takich badań z wykorzystaniem gatunków innych niż gryzonie należy zastosować zasady i procedury określone w niniejszej metodzie badawczej, wraz z zasadami i procedurami określonymi w rozdziale B.27 niniejszego załącznika, dotyczącym 90-dniowego badania toksyczności doustnej wywołanej powtarzanym dawkowaniem z wykorzystaniem gatunków innych niż gryzonie (6), przy wprowadzeniu odpowiednich modyfikacji. Dalsze wytyczne są dostępne w wytycznych OECD nr 116 dotyczących opracowywania i przeprowadzania badań toksyczności przewlekłej i rakotwórczości (7).
3. Trzy główne drogi podania stosowane w badaniach rakotwórczości to droga pokarmowa, dermalna i inhalacyjna. Wybór drogi podania zależy od fizycznych i chemicznych właściwości substancji badanej oraz głównej drogi narażenia ludzi. Dodatkowe informacje na temat wyboru drogi narażenia przedstawiono w wytycznych nr 116 (7).
4. W ramach niniejszej metody badawczej kładzie się nacisk na narażenie drogą pokarmową, która jest drogą najczęściej stosowaną w badaniach rakotwórczości. Przeprowadzenie badań rakotwórczości obejmujących narażenie drogą dermalną lub inhalacyjną może być również konieczne do oceny ryzyka dla zdrowia ludzi lub wymagane w ramach pewnych systemów regulacji, obojętne te drogi narażenia wymagają jednak badań znacznie złożonych technicznie. Takie badania będą musiały zostać opracowane dla poszczególnych przypadków, jednak opisana w niniejszym rozdziale metoda badawcza mająca na celu ocenę i oszacowanie rakotwórczości przy pokarmowej drodze podania może stanowić podstawę dla protokołu badania z zastosowaniem inhalacyjnej lub dermalnej drogi podania, z zastrzeżeniem zaleceń dotyczących okresów poddawania działaniu substancji, parametrów klinicznych, parametrów analizy patologicznej itp. Dostępne są wytyczne OECD dotyczące podawania substancji badanych drogą dermalną (7) i drogą inhalacyjną (7) (8). Podczas opracowywania badań uwzględniających dłuższy okres narażenia drogą inhalacyjną należy w szczególności wziąć pod uwagę rozdział B.8 niniejszego załącznika (9) oraz rozdział B.29 niniejszego załącznika (10), a także wytyczne OECD dotyczące badania ostrej toksyczności inhalacyjnej (8). W przypadku badań przeprowadzanych drogą dermalną należy uwzględnić rozdział B.9 niniejszego załącznika (11).
5. Badanie rakotwórczości dostarcza informacji na temat potencjalnych zagrożeń dla zdrowia, których pojawienie się jest prawdopodobne w przypadku powtarzającego się narażenia przez okres trwający nawet przez całą długość życia wykorzystanego w badaniu gatunku. Badanie dostarczy informacji na temat skutków toksycznych substancji badanej, w tym na temat potencjalnej rakotwórczości, i może wskazać organy docelowe i możliwość akumulacji. Badanie może także dostarczyć szacunkowych informacji na temat poziomu dawkowania, przy którym nie obserwuje się szkodliwych zmian w kontekście skutków toksycznych oraz, w przypadku niegenotoksycznych substancji rakotwórczych, w odniesieniu do reakcji guzów, które to informacje można wykorzystać do ustalenia kryteriów bezpieczeństwa dla narażenia ludzi. Podkreśla się również konieczność uważnych obserwacji klinicznych zwierząt, aby uzyskać możliwie jak najwięcej informacji.
6. Cele badań rakotwórczości w ramach niniejszej metody badawczej obejmują:
 - określenie właściwości rakotwórczych substancji badanej, skutkujących zwiększonym występowaniem nowotworów, zwiększonym odsetkiem nowotworów złośliwych lub szybszym wystąpieniem nowotworów, w porównaniu z równoległą grupą kontrolną,
 - określenie organu lub organów docelowych rakotwórczości,
 - określenie czasu, po którym upływie pojawiają się nowotwory,

- scharakteryzowanie zależności dawka-odpowiedź w odniesieniu do guzów,
- określenie poziomu dawkowania, przy którym nie obserwuje się szkodliwych zmian (NOAEL) lub punktu wyjścia dla ustalenia dawki wyznaczającej (BMD),
- ekstrapolacja skutków rakotwórczych do poziomów narażenia ludzi przy niskich dawkach,
- pozyskanie danych do zbadania hipotez dotyczących sposobu działania (2) (7) (12) (13) (14) (15).

WSTĘPNE ROZWAŻANIA

7. Podczas oceny i oszacowania potencjalnej rakotwórczości substancji badanej laboratorium badawcze powinno rozważyć wszystkie dostępne informacje na temat substancji badanej przed rozpoczęciem badania, w celu opracowania takiego projektu badania, który umożliwi zbadanie potencjalnej rakotwórczości w sposób bardziej efektywny oraz zminimalizuje wykorzystanie zwierząt. Szczególnie istotne są informacje na temat sposobu działania substancji, co do której podejrzewa się, że jest substancją rakotwórczą, oraz uwzględnienie takiego sposobu działania (2) (7) (12) (13) (14) (15), ponieważ optymalny projekt badania może różnić się w zależności od tego, czy substancja badana jest znaną genotoksyczną substancją rakotwórczą, czy też substancją, co do której podejrzewa się działanie genotoksyczne i rakotwórcze. Dalsze wytyczne na temat kwestii dotyczących sposobu działania można znaleźć w wytycznych nr 116 (7).
8. Informacje, które będą pomocne w opracowywaniu projektu badania, obejmują tożsamość, strukturę chemiczną i właściwości fizykochemiczne substancji badanej; wyniki wszelkich badań toksyczności *in vitro* lub *in vivo*, w tym badań genotoksyczności; spodziewane zastosowania i potencjalne narażenie ludzi; dostępne dane dotyczące (Q)SAR, mutagenności/genotoksyczności, rakotwórczości oraz inne dane toksykologiczne dotyczące strukturalnie powiązanych związków; dostępne dane toksykokinetyczne (jeśli dostępne, dane dotyczące kinetyki jednorazowego podania i podania powtórzonego) oraz dane pochodzące z innych badań narażenia powtarzanego. Ocenę rakotwórczości należy przeprowadzić wyłącznie po uzyskaniu wstępnych informacji na temat toksyczności na podstawie 28-dniowych lub 90-dniowych badań toksyczności wywołanej podaniem powtórzonym. Użytecznych informacji mogą dostarczyć także krótkoterminowe badania dotyczące inicjacji i promocji w kontekście rakotwórczości. W kontekście badania rakotwórczości należy rozważyć podejście oparte na etapach, w ramach ogólnej oceny potencjalnych niepożądanych skutków dla zdrowia wywoływanych przez daną substancję badaną (16) (17) (18) (19).
9. Metody statystyczne najbardziej odpowiednie do analizy wyników, przy uwzględnieniu układu doświadczalnego i celów badania, należy ustalić przed rozpoczęciem badania. Wśród kwestii, jakie należy rozważyć, znajduje się pytanie, czy dane statystyczne powinny zawierać korektę uwzględniającą zwierzęta, które przeżyły, analizę łącznego ryzyka wystąpienia guza w odniesieniu do okresu przeżycia, analizę tego, jak szybko wystąpił guz, oraz analizę w przypadku przedwczesnego uśmiercenia jednej grupy lub większej liczby grup. Wytyczne dotyczące odpowiednich analiz statystycznych i kluczowych odniesień do uznanych na świecie metod statystycznych zawarto w wytycznych nr 116 (7), a także wytycznych nr 35 dotyczących analizy i ewaluacji badań toksyczności przewlekłej i rakotwórczości (20).
10. Podczas przeprowadzania badania rakotwórczości należy w każdym przypadku kierować się głównymi zasadami i rozważaniami przedstawionymi w wytycznych OECD nr 19 dotyczących rozpoznawania, oceny i stosowania objawów klinicznych jako humanitarnego punktu końcowego w odniesieniu do zwierząt wykorzystywanych w badaniu oceny bezpieczeństwa (21), a zwłaszcza pkt 62 tego dokumentu. Punkt ten stanowi, że: *W badaniach z zastosowaniem powtarzanej dawki, jeśli zwierzę wykazuje objawy kliniczne, które postępują, prowadząc do dalszego pogorszenia jego stanu, należy podjąć uzasadnioną decyzję, czy w sposób humanitarny uśmiercić takie zwierzę. Taka decyzja powinna opierać się na rozważeniu wartości informacji, jakie można uzyskać dzięki dalszemu utrzymywaniu takiego zwierzęcia w ramach badania, i uwzględniać ogólny stan takiego zwierzęcia. Jeśli zapadnie decyzja o pozostawieniu takiego zwierzęcia w badaniu, częstotliwość obserwacji należy w razie potrzeby zwiększyć. Można także tymczasowo zaprzestać dawkowania, jeśli nie wpłynie to w sposób niekorzystny na cel badania, a zmniejszy cierpienie lub stres odczuwany przez zwierzę, lub też można zmniejszyć podawaną dawkę.*
11. Szczegółowe wytyczne dotyczące zasad doboru dawek w przypadku badań toksyczności przewlekłej i rakotwórczości, a także omówienie takich zasad, można znaleźć w wytycznych nr 116 (7), oraz w publikacjach Międzynarodowego Instytutu Nauk Biologicznych (ILSI) (22) (23). Główna strategia doboru dawek zależy od głównego celu lub celów badania (pkt 6). Podczas doboru odpowiednich poziomów dawek należy zachować równowagę między kontrolą zagrożenia a określeniem reakcji na niskie dawki i ich istotnością. Ma to szczególne znaczenie w sytuacji, w której planuje się przeprowadzić łączone badanie toksyczności przewlekłej i rakotwórczości (rozdział B.33 niniejszego załącznika) (pkt 12).
12. Należy rozważyć przeprowadzenie łączonego badania toksyczności przewlekłej i rakotwórczości (rozdział B.33 niniejszego załącznika), zamiast przeprowadzenia osobno badania toksyczności przewlekłej (rozdział B.30 niniejszego załącznika) i badania rakotwórczości (niniejsza metoda badawcza B.32). W porównaniu z przeprowadzaniem dwóch osobnych badań łączone badanie zapewni większą efektywność pod względem czasu i kosztów, a jednocześnie nie obniża jakości danych, czy to na etapie badania toksyczności przewlekłej, czy też na etapie badania rakotwórczości. Przy przeprowadzaniu łączonego badania toksyczności przewlekłej i rakotwórczości (rozdział B.33 niniejszego załącznika) należy jednak zwrócić szczególną uwagę na zasady doboru dawek (pkt 11 i 22–25), a także uznać się, że w przypadku pewnych ram regulacyjnych wymagane może być przeprowadzenie takich badań osobno.

13. Definicje stosowane w kontekście niniejszej metody badawczej można znaleźć na końcu tego rozdziału oraz w wytycznych nr 116 (7).

ZASADA BADANIA

14. Substancję badaną podaje się codziennie w dawkach stopniowanych kilku grupom zwierząt badanych przez większą część długości ich życia, zazwyczaj drogą pokarmową. Właściwe może być także badanie przy zastosowaniu drogi inhalacyjnej lub dermalnej. Zwierzęta obserwuje się uważnie w celu wykrycia objawów toksyczności i pojawienia się zmian nowotworowych. Zwierzęta, które zginą lub zostaną uśmiercone podczas badania, są poddawane sekcji zwłok, a zwierzęta, które przeżyją, są, po zakończeniu badania, uśmiercane i poddawane sekcji zwłok.

OPIS METODY

Wybór gatunku zwierząt

15. Niniejsza metoda badawcza obejmuje przede wszystkim ocenę i oszacowanie rakotwórczości u gryzoni (pkt 2). Wykorzystanie gatunków innych niż gryzonia można rozważyć, jeśli dostępne dane wskazują, że takie gatunki są bardziej odpowiednie w kontekście określenia skutków dla zdrowia u ludzi. Wybór gatunku należy uzasadnić. Preferowanym gatunkiem gryzoni jest szczur, można jednak wykorzystać także inne gatunki, np. mysz. Choć w przeszłości wykorzystanie myszy w badaniach rakotwórczości mogło ograniczać użyteczność takich badań (24) (25) (26), w ramach niektórych obowiązujących przepisów nadal wymaga się badania rakotwórczości z wykorzystaniem myszy, o ile nie ustalono, że takie badanie nie jest konieczne z naukowego punktu widzenia. Szczury i myszy są jak dotąd preferowanymi modelami doświadczalnymi z uwagi na ich względnie krótką długość życia, powszechne wykorzystywanie w badaniach farmakologicznych i toksykologicznych, podatność na powstawanie guzów, a także dostępność dostatecznie scharakteryzowanych szczepów. Z racji tych cech dostępne są znaczne ilości informacji na temat ich fizjologii i patologii. Dodatkowe informacje na temat wyboru gatunku i szczepu przedstawiono w wytycznych nr 116 (7).
16. Zaleca się wykorzystanie zdrowych, młodych, dorosłych zwierząt pochodzących ze szczepów powszechnie wykorzystywanych w laboratoriach. Badanie rakotwórczości należy przeprowadzić najlepiej z wykorzystaniem zwierząt z tego samego szczepu i źródła, z którego pochodziły zwierzęta wykorzystane we wstępnym badaniu lub wstępnych badaniach toksyczności o krótszym trwania, niemniej jednak, jeśli wiadomo, że w przypadku zwierząt z danego szczepu i źródła pojawiają się problemy z osiągnięciem powszechnie przyjętego kryterium przeżycia w badaniach długoterminowych [zob. wytyczne nr 116 (7)], należy rozważyć wykorzystanie szczepu zwierząt, który charakteryzuje się akceptowalnym wskaźnikiem przeżycia w przypadku badań długoterminowych. Samice powinny być nieródkami i nie mogą być w ciąży.

Warunki przetrzymywania i karmienia

17. Zwierzęta można przetrzymywać pojedynczo lub w klatkach w małych grupach składających się z osobników tej samej płci; przetrzymywanie zwierząt pojedynczo należy rozważyć, wyłącznie jeśli jest to uzasadnione z naukowego punktu widzenia (27) (28) (29). Klatki należy rozmieścić w taki sposób, aby zminimalizować potencjalny wpływ ich układu. Temperatura w pomieszczeniach badawczych, w których przetrzymuje się zwierzęta, powinna wynosić 22 °C (\pm 3 °C). Chociaż wilgotność względna powinna wynosić co najmniej 30 % i pożądaną jest, by poza czasem czyszczenia pomieszczenia nie przekraczała 70 %, należy dążyć do utrzymania jej na poziomie 50–60 %. Oświetlenie powinno być sztuczne, w cyklu 12 godzin światła, 12 godzin ciemności. Do żywienia można stosować konwencjonalne pasze laboratoryjne z nieograniczonym dostępem do wody pitnej. Pasza powinna spełniać wszystkie wymogi związane z odżywianiem badanych gatunków, a obecna w niej zawartość pokarmowych substancji zanieczyszczających, w tym między innymi pozostałości pestycydów, trwałych zanieczyszczeń organicznych, fitoestrogenów, metali ciężkich i mikotoksyn, które mogą wpłynąć na wynik badania, powinna być możliwie jak najniższa. Okresowo należy generować informacje analityczne na temat poziomów składników odżywczych i pokarmowych substancji zanieczyszczających, a przynajmniej na początku badania oraz w przypadku zmiany stosowanej partii. Takie informacje należy uwzględnić w sprawozdaniu końcowym. Informacje analityczne na temat wody pitnej stosowanej w badaniu należy przedstawić w podobny sposób. Na wybór pokarmu może mieć wpływ potrzeba zapewnienia odpowiedniej mieszaniny substancji badanej, a także potrzeba spełnienia wymogów związanych z odżywianiem zwierząt, jeśli substancję badaną podaje się wraz z pokarmem.

Przygotowanie zwierząt

18. Należy wykorzystać zdrowe zwierzęta aklimatyzowane do warunków laboratoryjnych przez okres co najmniej 7 dni, oraz niepoddawane wcześniej procedurom badawczym. W przypadku gryzoni dawkowanie substancji zwierzętom należy rozpocząć możliwie jak najszybciej po odsadzeniu i aklimatyzacji, oraz najlepiej zanim zwierzęta osiągną wiek 8 tygodni. Badane zwierzęta należy scharakteryzować ze względu na ich gatunek, szczep, źródło, płć, wagę i wiek. W chwili rozpoczęcia badania odchylenia masy dla obu płci wykorzystanych zwierząt powinny być minimalne i nie przekraczać \pm 20 % średniej masy wszystkich zwierząt wykorzystanych w ramach badania, osobno dla każdej płci. Należy losowo przydzielić zwierzęta do grup kontrolnych i grup poddawanych działaniu substancji badanej. Po randomizacji między grupami nie powinno być znaczących różnic w średniej wadze osobników w odniesieniu do obu płci. Jeśli odnotowano statystycznie istotne różnice, randomizację należy powtórzyć, jeśli jest to możliwe. Każdemu zwierzęciu należy przydzielić niepowtarzalny numer identyfikacyjny i w sposób stały oznaczyć je tym numerem poprzez jego wytatuowanie, wszczepienie implantu z chipem lub za pomocą innej odpowiedniej metody.

PROCEDURA

Liczba i płeć zwierząt

19. Należy wykorzystać zwierzęta obu płci. Należy wykorzystać wystarczającą liczbę zwierząt, aby umożliwić szczegółowe szacunki z punktu widzenia biologicznego i statystycznego. W związku z powyższym każda grupa otrzymująca dawki oraz równoległa grupa kontrolna powinny liczyć co najmniej 50 zwierząt każdej płci. W zależności od celu badania można zwiększyć moc statystyczną kluczowych szacunków poprzez zróżnicowane przydzielenie zwierząt nierównomiernie do grup otrzymujących różne dawki, przy czym w grupach otrzymujących niskie dawki powinno być więcej niż 50 zwierząt; np. w celu oszacowania rakotwórczości przy niskich dawkach. Należy jednak pamiętać, że umiarkowane zwiększenie liczebności grupy oznacza względnie niewielkie zwiększenie mocy statystycznej badania. Więcej informacji na temat projektu badania pod względem statystycznym oraz doboru poziomów dawek w celu zmaksymalizowania mocy statystycznej zawarto w wytycznych nr 116 (7).

Ustalenia dotyczące uśmiercania w trakcie trwania doświadczenia oraz grup satelitarnych (wskaźnikowych)

20. W ramach badania można założyć uśmiercanie zwierząt w trakcie trwania doświadczenia, np. po upływie 12 miesięcy, w celu uzyskania informacji na temat progresji zmian nowotworowych oraz informacji dotyczących mechanizmu działania, jeśli jest to uzasadnione z naukowego punktu widzenia. Jeśli takie informacje są już dostępne dzięki poprzednim badaniom toksyczności dawki powtórzonej substancji badanej, uśmiercanie w trakcie trwania doświadczenia może nie być uzasadnione z naukowego punktu widzenia. Jeśli projekt badania przewiduje uśmiercanie w trakcie trwania doświadczenia, liczba zwierząt w każdej grupie otrzymującej dawkę przeznaczoną do uśmiercenia w trakcie trwania doświadczenia będzie wynosić zazwyczaj 10 zwierząt każdej płci, zaś całkowitą liczbę zwierząt przewidzianych w projekcie badania należy zwiększyć o liczbę zwierząt przeznaczonych do uśmiercenia przed zakończeniem badania. W celu monitorowania w trakcie badania, w razie konieczności, statusu choroby, można uwzględnić dodatkową grupę zwierząt wskaźnikowych (zazwyczaj 5 zwierząt każdej płci) (30). Dalsze wytyczne przedstawiono w wytycznych nr 116 (7).

Grupy otrzymujące dawki oraz dawkowanie

21. Wytyczne dotyczące wszystkich aspektów doboru dawek oraz zróżnicowania poziomu dawek zawarto w wytycznych nr 116 (7). Należy zastosować co najmniej trzy poziomy dawek oraz ustanowić równoległą grupę kontrolną. Poziomy dawek będą zazwyczaj oparte na wynikach krótkoterminowych badań z powtarzanym dawkowaniem lub badań ustalających zakres dawkowania oraz należy uwzględnić w tym kontekście wszelkie istniejące dane toksykologiczne i toksykokinetyczne dostępne w odniesieniu do substancji badanej lub substancji powiązanych.
22. O ile nie ogranicza tego fizykochemiczny charakter biologicznych skutków działania substancji badanej, należy wybrać najwyższy poziom dawki w celu określenia głównych organów docelowych oraz skutków toksycznych, jednocześnie unikając cierpienia, toksyczności ostrej, chorobowości lub śmierci. Uwzględniając czynniki przedstawione w pkt 23 poniżej, należy zazwyczaj wybrać najwyższy poziom dawki w celu uzyskania dowodów na toksyczność, potwierdzonych, na przykład, wolniejszym przybieraniem na wadze (o około 10 %). W zależności od celów badania (zob. pkt 6) można wybrać górną dawkę, niższą od dawki potwierdzającej toksyczność, np. jeśli dawka powoduje niekorzystny skutek istotny dla badania, który ma jednak niewielki wpływ na długość życia czy wagę ciała.
23. Poziomy dawek i zróżnicowanie ich poziomów można dobrać tak, by określić odpowiedź zależną od dawki oraz, w zależności od sposobu działania substancji badanej, NOAEL lub inny pożądaný wynik badania, np. BMD (zob. pkt 25) przy najniższym poziomie dawki. Przy stosowaniu niższych dawek należy rozważyć takie czynniki, jak spodziewane nachylenie krzywej dawka-odpowiedź, dawki, przy których mogą pojawić się istotne zmiany w metabolizmie, lub charakter działania toksycznego, przy którym oczekuje się wartości granicznej lub punktu wyjścia dla ekstrapolacji dla niskiej dawki.
24. Wybrane zróżnicowanie poziomów dawki będzie zależeć od właściwości substancji badanej i nie może zostać z góry określone w metodzie badawczej, jednak zastosowanie dwóch do czterech odstępów pomiędzy kolejnym dawkowaniem często zapewnia dobre wyniki badania dla ustalenia malejących poziomów dawki, a dodanie czwartej grupy badanej jest często rozwiązaniem preferowanym w porównaniu ze stosowaniem bardzo dużych interwałów między dawkowaniem (np. współczynnik większy niż 6–10). Zasadniczo należy unikać stosowania współczynników większych niż 10, a w przypadku ich zastosowania należy je uzasadnić.
25. Jak omówiono to w wytycznych OECD nr 116 (7), kwestie, jakie należy rozważyć przy doborze dawki, obejmują:
- znane lub podejrzewane nieliniowości lub punkty przegięcia krzywej dawka-odpowiedź,
 - toksykokinetykę oraz zakresy dawkowania, przy których występuje lub nie występuje indukcja metaboliczna, nasylenie lub też nieliniowość między zewnętrznymi a wewnętrznymi dawkami,
 - zmiany prekursorowe, markery skutku, lub wskaźniki działania kluczowych podstawowych procesów biologicznych,
 - kluczowe (lub podejrzewane) aspekty sposobu działania, takie jak dawki, przy których zaczyna pojawiać się cytotoksyczność, zakłócone zostają poziomy hormonów, przestają działać mechanizmy homeostaticzne itp.,

- regiony krzywej dawka-odpowieź, gdzie konieczne są szczególnie solidne szacunki, np. w zakresie spodziewanej BMD lub podejrzewanej wartości granicznej,
 - uwzględnienie spodziewanych poziomów narażenia ludzi.
26. Grupa kontrolna powinna być grupą niepoddawaną działaniu substancji badanej lub grupą kontrolną nośnika, jeśli do podawania substancji badanej zastosowano nośnik. Z wyjątkiem poddawania działaniu substancji badanej, zwierzęta z grupy kontrolnej należy traktować w sposób identyczny ze sposobem traktowania osobników z grup badanych. Jeśli zastosowano nośnik, grupa kontrolna otrzymuje nośnik w najwyższej objętości stosowanej wśród grup otrzymujących dawki. Jeśli substancję badaną podaje się wraz z pokarmem i jeśli powoduje ona znacznie zmniejszone pobranie pokarmu z powodu jego obniżonych wartości smakowych, pomocna może być dodatkowa grupa kontrolna zwierząt otrzymujących pokarm w ilości spożywanej przez zwierzęta z grupy badanej (pair-fed), która zapewni odpowiedniejszą kontrolę.

Przygotowanie dawek i podanie substancji badanej

27. Substancję badaną zazwyczaj podaje się drogą pokarmową, wraz z pokarmem lub wodą pitną, lub też za pomocą sondy. Dodatkowe informacje na temat dróg i metod podania przedstawiono w wytycznych nr 116 (7). Droga i metoda podania zależą od celu badania, fizykochemicznych właściwości substancji badanej, jej biodostępności oraz głównej drogi i metody narażenia ludzi. Należy przedstawić uzasadnienie wybranej drogi i metody podania. W trosce o dobrostan zwierząt należy w normalnych warunkach wybrać sondę żołądkową wyłącznie dla tych substancji, dla których taka droga i metoda podania w sposób uzasadniony odzwierciedlają potencjalne narażenie ludzi (np. produkty farmaceutyczne). Substancje występujące w pokarmie lub środowisku naturalnym, w tym pestycydy, podaje się zazwyczaj wraz z pokarmem lub wodą pitną. W przypadku jednak niektórych scenariuszy, np. narażenia zawodowego, podawanie substancji za pomocą innych dróg może być bardziej właściwe.
28. W razie potrzeby substancję badaną rozpuszcza się lub sporządza się jej zawiesinę w odpowiednim nośniku. W stosownych przypadkach należy wziąć pod uwagę następujące cechy nośnika i innych dodatków: wpływ na wchłanianie, dystrybucję, metabolizm oraz zatrzymywanie substancji badanej; wpływ na chemiczne własności substancji badanej, które mogą zmienić jej charakterystykę toksyczną; oraz wpływ na spożycie pokarmu lub wody, lub też na stan odżywienia zwierząt. Zaleca się, w miarę możliwości, najpierw rozważyć zastosowanie roztworu wodnego/zawiesiny, następnie roztworu/emulsji w oleju (np. z zastosowaniem oleju kukurydzianego), a potem możliwego roztworu w innych nośnikach. W przypadku nośników innych niż woda charakterystyka toksyczna nośnika powinna być znana. Dostępne powinny być także informacje na temat stabilności substancji badanej oraz jednorodności roztworów dawek lub pokarmu z dawkami (w zależności od sytuacji) w warunkach podawania (np. pokarm).
29. W przypadku substancji podawanych w pokarmie lub wodzie pitnej ważne jest dopilnowanie, by ilości substancji badanej nie zakłócały prawidłowej równowagi odżywiania lub spożycia wody. W przypadku długoterminowych badań toksyczności z zastosowaniem podawania dawek wraz z pokarmem stężenie substancji badanej w paszy nie powinno w normalnych warunkach przekraczać górnego limitu 5 % całego pokarmu, aby uniknąć zakłócenia równowagi odżywiania. Przy podawaniu substancji badanej wraz z pokarmem można zastosować stałe stężenie w pokarmie (mg/kg pokarmu lub ppm) lub też stały poziom dawki w odniesieniu do masy ciała zwierzęcia (mg/kg masy ciała), obliczany cotygodniowo. Należy określić, które rozwiązanie zastosowano.
30. Przy podawaniu substancji drogą pokarmową zwierzętom podaje się dawki substancji badanej codziennie (siedem dni w tygodniu), zazwyczaj przez okres 24 miesięcy w przypadku gryzoni (zob. także pkt 32). Zastosowanie innego systemu dawkowania, np. przez pięć dni w tygodniu, należy uzasadnić. Przy podawaniu substancji drogą dermalną zwierzęta zazwyczaj poddaje się działaniu substancji badanej przez co najmniej 6 godzin dziennie, 7 dni w tygodniu, zgodnie z rozdziałem B.9 niniejszego załącznika (11), przez okres 24 miesięcy. Narażenie drogą inhalacyjną stosuje się przez 6 godzin dziennie, 7 dni w tygodniu, ale możliwe jest zastosowanie narażenia także przez 5 dni w tygodniu, jeśli zostanie to uzasadnione. Okres narażenia zazwyczaj wynosi 24 miesiące. Jeśli gatunki gryzoni inne niż szczury poddaje się narażeniu wyłącznie poprzez nos, maksymalne okresy narażenia można dostosować tak, by zminimalizować charakterystyczny dla danego gatunku stres. W przypadku stosowania okresu narażenia krótszego niż 6 godzin dziennie należy przedstawić stosowne uzasadnienie. Zob. również rozdział B.8 niniejszego załącznika (9).
31. Jeśli substancję badaną podaje się zwierzętom za pomocą sondy, należy dokonywać tego z użyciem sondy żołądkowej lub odpowiedniej kaniuli intubacyjnej, każdego dnia o podobnych porach. Zazwyczaj podaje się pojedynczą dawkę raz dziennie; jeśli jednak substancja jest, na przykład, substancją wykazującą miejscowe działanie drażniące, możliwe jest zachowanie dziennej mocy dawki poprzez podawanie jej jako dawki dzielonej (dwa razy dziennie). Maksymalna objętość cieczy, jaką można podać jednorazowo, zależy od wielkości badanego zwierzęcia. Objętość taka powinna być możliwie jak najniższa i nie powinna w normalnych warunkach przekraczać 1 ml/100 g masy ciała w przypadku gryzoni (31). Zmienność stosowanej objętości należy zminimalizować poprzez dostosowanie stężenia, aby zapewnić stałą objętość przy wszystkich poziomach dawek. Wyjątkiem są substancje potencjalnie żrące lub wykazujące działanie drażniące, które należy rozcieńczyć w celu uniknięcia miejscowych ostrych skutków. Należy unikać badania z użyciem stężeń, które mogą być żrące lub wykazujące działanie drażniące dla przewodu pokarmowego.

Czas trwania badania

32. W przypadku gryzoni czas trwania badania będzie zazwyczaj wynosił 24 miesiące, co stanowi większą część standardowej długości życia zwierząt, które mają zostać wykorzystane w takim badaniu. Można ustalić dłuższy lub krótszy czas trwania badania w zależności od długości życia szczepu gatunku zwierząt wykorzystanego w badaniu, taką decyzję należy jednak uzasadnić. W przypadku pewnych szczepów myszy, np. szczepów AKR/J, C3H/J lub C57BL/6J, właściwszy może być czas trwania badania wynoszący 18 miesięcy. Poniżej znajdują się pewne wytyczne dotyczące czasu trwania i zakończenia badania oraz przeżycia; dalsze wytyczne, w tym rozważenia dotyczące dopuszczalności rakotwórczości ujemnie powiązanej z przeżyciem, przedstawiono w wytycznych OECD nr 116 dotyczących opracowywania i przeprowadzania badań toksyczności przewlekłej i rakotwórczości (7).
- Zakończenie badania należy rozważyć, jeśli liczba osobników, które pozostały przy życiu w grupach otrzymujących niższe dawki lub grupie kontrolnej, spadnie poniżej 25 %.
 - Jeśli wyłącznie osobniki z grupy otrzymującej wysokie dawki padną przedwcześnie z powodu toksyczności, nie powinno to powodować zakończenia badania.
 - Przeżycie osobników obu płci należy rozważyć osobno.
 - Nie należy przedłużać badania, jeśli dane dostępne dzięki badaniu stały się niewystarczające, aby umożliwić oszacowanie wiarygodne pod względem statystycznym.

OBSERWACJE

33. Wszystkie zwierzęta należy sprawdzić pod kątem chorobowości i upadkowości, zazwyczaj na początku i pod koniec każdego dnia, włącznie z weekendami i dniami wolnymi od pracy. Dodatkowo zwierzęta należy sprawdzać raz dziennie pod kątem szczególnych objawów istotnych z toksykologicznego punktu widzenia, a w przypadku podawania substancji poprzez sondę, uwzględniając okres szczytowego występowania spodziewanych skutków po podaniu dawki. Szczególną uwagę należy zwrócić na rozwój guzów; należy odnotować czas pojawienia się guza, jego położenie, wymiary, wygląd oraz progresję każdego wyraźnie widocznego lub wyczuwalnego guza.

Masa ciała, spożycie pokarmu/wody i wydajność pokarmu

34. Wszystkie zwierzęta należy zważyć na początku rozpoczęcia poddawania ich działaniu substancji badanej, a także co najmniej raz w tygodniu przez pierwsze 13 tygodni, a po tym okresie – co najmniej raz w miesiącu. Pomiarów spożycia pokarmu i wydajności pokarmu należy dokonywać co najmniej raz w tygodniu przez pierwsze 13 tygodni, a po tym okresie – co najmniej raz w miesiącu. Spożycie wody należy mierzyć co najmniej raz w tygodniu przez pierwsze 13 tygodni, a po tym okresie – co najmniej raz w miesiącu, jeśli substancję badaną podaje się wraz z wodą pitną. Pomiaru spożycia wody należy rozważyć także w przypadku badań, w których zaszły zmiany związane ze spożyciem wody.

Hematologia, biochemia kliniczna i inne pomiary

35. W celu zmaksymalizowania informacji uzyskanych dzięki badaniu, zwłaszcza na temat kwestii związanych ze sposobem działania, próbki krwi można poddać analizie pod kątem hematologii i biochemii klinicznej, według uznania kierownika badania. Właściwe może być także przeprowadzenie analizy moczu. Dalsze wytyczne dotyczące wartości pobrania takich próbek w ramach badania rakotwórczości przedstawiono w wytycznych nr 116 (7). Jeśli uznano to za właściwe, pobranie próbek krwi na potrzeby oznaczenia hematologicznego i oznaczenia parametrów biochemii klinicznej, a także analizę moczu, można przeprowadzić w ramach uśmiercania w trakcie trwania doświadczenia (pkt 20) oraz wraz z zakończeniem badania, z wykorzystaniem co najmniej 10 zwierząt każdej płci i z każdej grupy. Probki krwi należy pobrać z określonego miejsca, na przykład poprzez nakłucie serca lub z zatoki oczodołowej tylnej, w znieczuleniu, oraz w stosownych przypadkach przechowywać we właściwych warunkach. Do zbadania można przygotować również rozmazy krwi, zwłaszcza jeśli organem docelowym wydaje się szpik kostny, choć wartość takiego badania w celu oceny rakotwórczości/potencjału onkogenicznego została zakwestionowana (32).

PATOLOGIA

Pełne rozpoznanie histopatologiczne

36. Wszystkie zwierzęta wykorzystane w badaniu, prócz zwierząt wskaźnikowych (zob. pkt 20) oraz innych zwierząt satelitarnych, należy poddać pełnemu, szczegółowemu rozpoznaniu histopatologicznemu, które obejmuje staranne zbadanie zewnętrznej powierzchni ciała, wszystkich otworów, jamy czaszki, jamy klatki piersiowej i jamy brzusznej oraz ich zawartości. Zwierzęta wskaźnikowe i inne zwierzęta satelitarne mogą wymagać rozpoznania histopatologicznego w zależności od poszczególnych przypadków, według uznania kierownika badania. Masa organów nie jest zazwyczaj częścią badania rakotwórczości, jako że w organach zachodzą zmiany związane z wiekiem, a rozwój guzów na późniejszych etapach uniemożliwia wykorzystanie takich danych. Takie dane mogą mieć jednak kluczowe znaczenie dla oszacowania wagi dowodów, w szczególności w kontekście kwestii związanych ze sposobem działania. Jeśli stanowią one część badania satelitarnego, takie dane należy zgromadzić nie później niż rok po rozpoczęciu badania.
37. Następujące tkanki należy zachować w roztworze utrwalającym najbardziej odpowiednim zarówno dla rodzaju tkanki, jak i planowanego późniejszego badania histopatologicznego (33) (tkanki podane w nawiasach kwadratowych są opcjonalne):

| | | | |
|---|--|---|---|
| wszystkie wyraźne zmiany | serce | trzustka | żołądek (przedżołądek, żołądek gruczołowy) |
| nadnercze | jelito kręte | przytarczyca | [zęby] |
| aorta | jelito czcze | nerw obwodowy | jądro |
| mózg (w tym części kresomózgowia, mózdzka i rdzenia/mostu) | nerka | przysadka | grasica |
| jelito ślepe | gruczoł łzowy | prostata | tarczycyca |
| szyjka macicy | wątroba | odbytnica | [język] |
| gruczoł koagulujący | płuco | gruczoł ślinowy | tchawica |
| okrężnica | węzły chłonne (powierzchnowe i głębokie) | pęcherzyk nasienny | pęcherz moczowy |
| dwunastnica | gruczoł mlekowy (obowiązkowo w przypadku samic oraz, jeśli wyraźnie nadaje się do analizy, również w przypadku samców) | mięsień szkieletowy | macica (w tym szyjka macicy) |
| najądrze | [górne drogi oddechowe, w tym nos, małżowiny nosowe oraz zatoki przynosowe] | skóra | [moczowód] |
| oko (w tym siatkówka) | przełyk | rdzeń kręgowy (na trzech odcinkach: szyjnym, śródpiersiowym i lędźwiowym) | [cewka moczowa] |
| [kość udowa ze stawem] | [opuszka wężowa] | śledziona | pochwa |
| pęcherzyk żółciowy (w przypadku gatunków innych niż szczur) | jajnik | [mostek] | odcinek szpiku kostnego lub świeżego aspiratu szpiku kostnego |
| gruczoł przyoczny | | | |

W przypadku organów parzystych, np. nerek lub nadnerczy, należy utrwalić obydwa organy. Wyniki badań klinicznych i innych badań mogą wskazać na konieczność zbadania dodatkowych tkanek. Organy uznane za prawdopodobne organy docelowe, w oparciu o znane właściwości substancji badanej, także należy zachować. W przypadku badań z zastosowaniem dermalnej drogi podania należy utrwalić organy zgodnie z listą określoną dla podania drogą pokarmową, przy czym kluczowe jest pobranie i zachowanie próbek skóry z miejsca aplikacji. W przypadku badań z zastosowaniem inhalacyjnej drogi podania, układając listę tkanek z dróg oddechowych do zachowania i zbadania, należy kierować się zaleceniami zawartymi w rozdziale B.8 i B.29 niniejszego załącznika. W przypadku innych organów/tkanek (oraz w uzupełnieniu określonych utrwalonych tkanek z dróg oddechowych) należy zbadać organy zgodnie z listą określoną dla pokarmowej drogi podania.

Histopatologia

38. Dostępne są wytyczne dotyczące najlepszych praktyk związanych z przeprowadzaniem toksykologicznych badań zmian patologicznych (33). Należy zbadać co najmniej następujące tkanki:

- wszystkie tkanki zwierząt z grup otrzymujących wysokie dawki i z grup kontrolnych,
- wszystkie tkanki zwierząt w stanie agonialnym lub uśmierconych podczas badania,
- wszystkie tkanki wykazujące makroskopowe nieprawidłowości, w tym guzy,
- w przypadku zaobserwowania w grupie otrzymującej wysoką dawkę histopatologicznych zmian związanych z poddawaniem zwierząt działaniu substancji badanej należy zbadać takie same tkanki pochodzące od wszystkich zwierząt ze wszystkich pozostałych grup otrzymujących dawki,
- w przypadku organów parzystych, np. nerek lub nadnerczy, należy zbadać obydwa organy.

DANE ORAZ SPORZĄDZENIE SPRAWOZDANIA

Dane

39. Należy przedstawić dane dotyczące każdego zwierzęcia, w odniesieniu do wszystkich poddawanych oszacowaniu parametrów. Dodatkowo wszystkie dane należy zestawić w postaci tabeli, przedstawiając w odniesieniu do każdej badanej grupy liczbę zwierząt na początku badania, liczbę zwierząt, które zginęły w trakcie trwania badania lub które uśmiercono z przyczyn humanitarnych, wraz z określeniem czasu, w którym nastąpiła śmierć lub humanitarne uśmiercenie, liczbę zwierząt wykazujących objawy toksyczności, opis obserwowanych objawów toksyczności, w tym czas ich pojawienia się, czas trwania, stopień ostrości wszelkich skutków toksycznych, liczbę zwierząt wykazujących zmiany, typ takich zmian oraz procent zwierząt wykazujących każdy typ zmiany. W tabelach z zestawieniem danych, oprócz klasyfikacji zmian, należy przedstawić średnie i odchylenia standardowe (dla danych z badań ciągłych) dotyczące zwierząt wykazujących skutki toksyczne lub zmiany.
40. Historyczne dane kontrolne mogą być cenne przy interpretacji wyników badania, np. jeśli istnieją przesłanki, że dane uzyskane z jednoczesnych kontroli są w sposób znaczący niestandardowe w porównaniu z najnowszymi danymi dotyczącymi zwierząt kontrolnych z tego samego obiektu/badanej kolonii. Historyczne dane kontrolne, jeśli poddaje się je oszacowaniu, powinny przedstawić to samo laboratorium i powinny się odnosić do zwierząt w tym samym wieku i z tego samego szczepu, oraz powinny zostać wygenerowane w ciągu pięciu lat przed rozpoczęciem rozważanego badania.
41. W stosownych przypadkach wyniki liczbowe należy poddawać oszacowaniu za pomocą właściwych i ogólnie przyjętych metod statystycznych. Metody statystyczne i dane poddawane analizie należy wybrać w czasie przygotowywania projektu badania (pkt 9). Taki wybór powinien uwzględniać, w razie potrzeby, korektę uwzględniającą zwierzęta, które przeżyły.

Sprawozdanie z badania

42. Sprawozdanie z badania powinno zawierać następujące informacje:

Badana substancja chemiczna

- cechy fizyczne, czystość i własności fizykochemiczne,
- dane dotyczące tożsamości,
- źródło substancji chemicznej,
- numer partii,
- świadectwo analizy chemicznej.

Nośnik (w stosownych przypadkach)

- uzasadnienie wyboru nośnika (jeżeli jest inny niż woda).

Badane zwierzęta

- wykorzystany gatunek/szczep oraz uzasadnienie takiego wyboru,
- liczba, wiek i płeć zwierząt na początku badania,
- źródło, warunki przebywania, pokarm itp.,
- masa ciała poszczególnych zwierząt na początku badania.

Warunki badania

- uzasadnienie drogi podania i doboru dawek,
- w stosownych przypadkach metody statystyczne zastosowane do analizy danych,
- szczegółowe informacje na temat postaci użytkowej substancji badanej/przygotowywania pokarmu,
- dane analityczne dotyczące osiąganego stężenia, stabilności i jednorodności preparatu,

- droga podania i szczegółowe dane dotyczące podawania substancji badanej,
- w przypadku badań z inhalacyjną drogą podania informacje o tym, czy podanie odbywa się wyłącznie przez nos, czy przez całe ciało,
- dawki rzeczywiste (mg/kg masy ciała/dzień), wskaźnik konwersji stężenia substancji badanej w pokarmie/wodzie pitnej (mg/kg lub ppm) do dawki rzeczywistej, jeśli ma to zastosowanie,
- szczegółowe informacje na temat jakości pokarmu i wody.

Wyniki (należy przedstawić zestawienie danych w tabeli oraz dane dotyczące poszczególnych zwierząt)

Wymogi ogólne

- dane dotyczące zwierząt, które przeżyły,
- masa ciała/zmiany masy ciała,
- dane dotyczące spożycia pokarmu, wyliczenia wydajności pokarmu, jeśli przeprowadzono, oraz dane dotyczące spożycia wody, w stosownych przypadkach,
- dane toksykokinetyczne, jeśli dostępne,
- oftalmoskopia (jeśli takie dane są dostępne),
- hematologia (jeśli takie dane są dostępne),
- biochemia kliniczna (jeśli takie dane są dostępne).

Ustalenia badań klinicznych

- objawy toksyczności,
- występowanie (i ostrość, jeśli poddano ją ocenie) wszelkich nieprawidłowości,
- rodzaj, ostrość i czas trwania obserwowanych objawów klinicznych (tak odwracalnych, jak i nieodwracalnych).

Dane dotyczące sekcji zwłok

- masa ciała w chwili zgonu,
- masa organów i ich współczynniki, jeśli takie dane są dostępne,
- ustalenia z sekcji zwłok; występowanie i stopień ostrości nieprawidłowości.

Histopatologia

- ustalenia histopatologiczne inne niż dotyczące nowotworów,
- ustalenia histopatologiczne dotyczące nowotworów,
- korelacja między objawami makroskopowymi i mikroskopowymi,
- szczegółowy opis wszystkich ustaleń histopatologicznych związanych z poddawaniem zwierząt działaniu substancji badanej, w tym klasyfikacja ostrości skutków,

— sprawozdanie z ewentualnej wzajemnej oceny preparatów.

W stosownych przypadkach, statystyczne opracowanie wyników

Omówienie wyników, w tym:

- omówienie wszelkich podejść modelowych,
- zależność dawka-odpowiedź,
- historyczne dane kontrolne,
- rozważenie wszelkich informacji na temat sposobu działania,
- określenie BMD, NOAEL lub LOAEL,
- znaczenie dla ludzi.

Wnioski

BIBLIOGRAFIA:

- (1) OECD (1995). Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing (Rzym, 1995), wewnętrzny dokument roboczy, Dyrekcja ds. Środowiska, OECD, Paryż.
- (2) EPA (2005). Guidelines for Carcinogen Risk Assessment Risk Assessment Forum U.S. Environmental Protection Agency, Waszyngton, D.C.
- (3) Combes RD, Gaunt I, Balls M (2004). A Scientific and Animal Welfare Assessment of the OECD Health Effects Test Guidelines for the Safety Testing of Chemicals under the European Union REACH System. ATLA 32: 163–208.
- (4) Barlow SM, Greig JB, Bridges JW i in. (2002). Hazard identification by methods of animal-based toxicology. Food. Chem. Toxicol. 40: 145–191.
- (5) Chhabra RS, Bucher JR, Wolfe M, Portier C (2003). Toxicity characterization of environmental chemicals by the US National Toxicology Programme: an overview. Int. J. Hyg. Environ. Health 206: 437–445.
- (6) Rozdział B.27 niniejszego załącznika. Badanie toksyczności podprzewlekłej drogą pokarmową – badania toksyczności drogą pokarmową na gatunkach innych niż gryzonie metodą powtarzanej 90-dniowej dawki.
- (7) OECD (2012). Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 and 453 – Second edition. Series on Testing and Assessment No. 116, dostępne na publicznej stronie OECD poświęconej wytycznych dotyczących badań, www.oecd.org/env/testguidelines.
- (8) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Series on Testing and Assessment nr 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paryż.
- (9) Rozdział B.8 niniejszego załącznika. Toksyczność powtarzanej (28 dni) dawki (inhalacyjna).
- (10) Rozdział B.29 niniejszego załącznika. Badanie podprzewlekłej toksyczności inhalacyjnej – 90-dniowe badania inhalacyjne z wykorzystaniem gatunków gryzoni.
- (11) Rozdział B.9 niniejszego załącznika. Toksyczność powtarzanej (28 dni) dawki (dermalna).
- (12) Boobis AR, Cohen SM, Dellarco V, McGregor D, Meek ME, Vickers C, Willcocks D, Farland W (2006). IPCS Framework for analyzing the Relevance of a Cancer Mode of Action for Humans. Crit. Rev. Toxicol, 36: 793–801.
- (13) Cohen SM, Meek ME, Klaunig JE, Patton DE, i Fenner-Crisp PA (2003). The human relevance of information on carcinogenic Modes of Action: An Overview. Crit. Rev. Toxicol. 33: 581–589.

- (14) Holsapple MP, Pitot HC, Cohen SN, Boobis AR, Klaunig JE, Pastoor T, Dellarco VL, Dragan YP (2006). Mode of Action in Relevance of Rodent Liver Tumors to Human Cancer Risk. *Toxicol. Sci.* 89: 51–56.
- (15) Meek EM, Bucher JR, Cohen SM, Dellarco V, Hill RN, Lehman-McKemmon LD, Longfellow DG, Pastoor T, Seed J, Patton DE (2003). A Framework for Human Relevance analysis of Information on Carcinogenic Modes of Action. *Crit. Rev. Toxicol.* 33: 591–653.
- (16) Carmichael NG, Barton HA, Boobis AR i in. (2006). Agricultural Chemical Safety Assessment: A Multisector Approach to the Modernization of Human Safety Requirements. *Critical Reviews in Toxicology* 36: 1–7.
- (17) Barton HA, Pastoor TP, Baetcke T i in. (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments. *Critical Reviews in Toxicology* 36: 9–35.
- (18) Doe JE, Boobis AR, Blacker A i in. (2006). A Tiered Approach to Systemic Toxicity Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. *Critical Reviews in Toxicology* 36: 37–68.
- (19) Cooper RL, Lamb JS, Barlow SM i in. (2006). A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. *Critical Reviews in Toxicology* 36: 69–98.
- (20) OECD (2002). Guidance Notes for Analysis and Evaluation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Series on Testing and Assessment nr 35 oraz Series on Pesticides nr 14, ENV/JM/MONO(2002)19, OECD, Paryż.
- (21) OECD (2000). Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation, Series on Testing and Assessment nr 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paryż.
- (22) Rhomberg LR, Baetcke K, Blancato J, Bus J, Cohen S, Conolly R, Dixit R, Doe J, Ekelman K, Fenner-Crisp P, Harvey P, Hattis D, Jacobs A, Jacobson-Kram D, Lewandowski T, Liteplo R, Pelkonen O, Rice J, Somers D, Turturro A, West W, Olin S (2007). Issues in the Design and Interpretation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies in Rodents: Approaches to Dose Selection. *Crit. Rev. Toxicol.* 37 (9): 729–837.
- (23) ILSI (Międzynarodowy Instytut Nauk Biologicznych) (1997). Principles for the Selection of Doses in Chronic Rodent Bioassays. Foran JA (red.). ILSI Press, Waszyngton, D.C.
- (24) Griffiths SA, Parkinson C, McAuslane JAN i Lumley CE (1994). The utility of the second rodent species in the carcinogenicity testing of pharmaceuticals. *The Toxicologist* 14(1):214.
- (25) Usui T, Griffiths SA i Lumley CE (1996). The utility of the mouse for the assessment of the carcinogenic potential of pharmaceuticals. W: D'Arcy POF & Harron DWG (red.). Proceedings of the Third International Conference on Harmonisation. Queen's University Press, Belfast. s. 279–284.
- (26) Carmichael NG, Enzmann H, Pate I, Waechter F (1997). The Significance of Mouse Liver Tumor Formation for Carcinogenic Risk Assessment: Results and Conclusions from a Survey of Ten Years of Testing by the Agrochemical Industry. *Environ Health Perspect.* 105: 1196–1203.
- (27) Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady 2010/63/UE z dnia 22 września 2010 r. w sprawie ochrony zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych (Dz.U. L 276 z 20.10.2010, s. 33).
- (28) National Research Council, 1985. Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication nr 86-23. Waszyngton D.C., Departament Zdrowia i Opieki Społecznej Stanów Zjednoczonych.
- (29) GV-SOLAS (Towarzystwo Nauk o Zwierzętach Laboratoryjnych, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 1988). Publication on the Planning and Structure of Animal Facilities for Institutes Performing Animal Experiments. ISBN 3-906255-04-2.

- (30) GV-SOLAS (Towarzystwo Nauk o Zwierzętach Laboratoryjnych, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 2006). Microbiological monitoring of laboratory animals in various housing systems.
 - (31) Diehl K-H, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, Vidal J-M, van de Vorstenbosch C. (2001). A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. *Journal of Applied Toxicology* 21: 15–23.
 - (32) Weingand K, i in. (1996). Harmonisation of Animal Clinical Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies. *Fundam. & Appl. Toxicol.* 29: 198–201.
 - (33) Crissman J, Goodman D, Hildebrandt P i in. (2004). Best Practices Guideline: Toxicological Histopathology. *Toxicologic Pathology* 32: 126–131.
-

Dodatek 1

DEFINICJA

Substancja badana: jakakolwiek substancja lub mieszanina badana za pomocą niniejszej metody badawczej.

B.33. ŁĄCZONE BADANIA TOKSYCZNOŚCI PRZEWLEKŁEJ/RAKOTWÓRCZOŚCI

WPROWADZENIE

1. Niniejsza metoda badawcza jest równoważna z dotyczącą badań wytyczną OECD nr 453 (2009). Pierwotny tekst TG 453 przyjęto w 1981 r. Opracowanie niniejszej zmienionej metody badawczej B.33 uznano za konieczne w celu odzwierciedlenia ostatnich zmian w dziedzinie dobrostanu zwierząt i wymogów regulacyjnych (1) (2) (3) (4) (5). Aktualizację niniejszej metody badawczej B.33 przeprowadzono równoległe z modyfikacjami rozdziału B.32 niniejszego załącznika, dotyczącego badań rakotwórczości, oraz rozdziału B.30 niniejszego załącznika, dotyczącego badań toksyczności przewlekłej, w celu uzyskania dodatkowych informacji na podstawie zwierząt wykorzystanych w badaniu oraz w celu zapewnienia dalszych szczegółowych informacji na temat doboru dawek. Niniejszą metodę badawczą opracowano w celu jej wykorzystywania w badaniach szerokiego zakresu chemikaliów, w tym pestycydów i chemikaliów przemysłowych. Należy zauważyć jednak, że niektóre dane szczegółowe i wymogi mogą różnić się w przypadku produktów farmaceutycznych [zob. wytyczne S1B dotyczące badania produktów farmaceutycznych pod kątem rakotwórczości Międzynarodowej Konferencji ds. Harmonizacji (ICH)].
2. Większość badań toksyczności przewlekłej i rakotwórczości przeprowadza się z wykorzystaniem gatunków gryzoni, w związku z czym niniejsza metoda badawcza przewidziana jest do stosowania przede wszystkim w badaniach z wykorzystaniem takich gatunków. W przypadku konieczności przeprowadzenia takich badań z wykorzystaniem gatunków innych niż gryzonie także można zastosować zasady i procedury określone w niniejszej metodzie badawczej, przy wprowadzeniu odpowiednich modyfikacji, wraz z zasadami i procedurami określonymi w rozdziale B.27 niniejszego załącznika, dotyczącym 90-dniowego badania toksyczności pokarmowej wywołanej powtarzanym dawkowaniem z wykorzystaniem gatunków innych niż gryzonie (6), zgodnie z wytycznymi OECD nr 116 dotyczącymi opracowywania i przeprowadzania badań toksyczności przewlekłej i rakotwórczości (7).
3. Trzy główne drogi podania stosowane w badaniach toksyczności przewlekłej/rakotwórczości to droga pokarmowa, dermalna i inhalacyjna. Wybór drogi podania zależy od fizycznych i chemicznych właściwości substancji badanej oraz głównej drogi narażenia ludzi. Dodatkowe informacje na temat wyboru drogi narażenia przedstawiono w wytycznych nr 116 (7).
4. W ramach niniejszej metody badawczej kładzie się nacisk na narażenie drogą pokarmową, która jest drogą najczęściej stosowaną w badaniach toksyczności przewlekłej i rakotwórczości. Przeprowadzenie długoterminowych badań obejmujących narażenie drogą dermalną lub inhalacyjną może być również konieczne do oceny ryzyka dla zdrowia ludzi lub wymagane w ramach pewnych systemów regulacji, obydwie te drogi narażenia wymagają jednak badań znacznie złożonych technicznie. Takie badania będą musiały zostać opracowane dla poszczególnych przypadków, jednak opisana w niniejszym rozdziale metoda badawcza mająca na celu ocenę i oszacowanie toksyczności przewlekłej i rakotwórczości przy pokarmowej drodze podania może stanowić podstawę dla protokołu badania z zastosowaniem inhalacyjnej lub dermalnej drogi podania, z zastrzeżeniem zaleceń dotyczących okresów poddawania działaniu substancji, parametrów klinicznych, parametrów analizy patologicznej itp. Dostępne są wytyczne OECD dotyczące podawania substancji badanych drogą inhalacyjną (7) (8) i drogą dermalną (7). Podczas opracowywania badań uwzględniających dłuższy okres narażenia drogą inhalacyjną należy w szczególności wziąć pod uwagę rozdział B.8 niniejszego załącznika (9) oraz rozdział B.29 niniejszego załącznika (10), a także wytyczne OECD dotyczące badania ostrej toksyczności inhalacyjnej (8). W przypadku badań przeprowadzanych drogą dermalną należy uwzględnić rozdział B.9 niniejszego załącznika (11).
5. Łączone badanie toksyczności przewlekłej/rakotwórczości dostarcza informacji na temat potencjalnych zagrożeń dla zdrowia, których pojawienie się jest prawdopodobne w przypadku narażenia powtarzającego się przez okres trwający nawet przez całą długość życia wykorzystanego w badaniu gatunku. Badanie dostarczy informacji na temat skutków toksycznych substancji badanej, w tym na temat potencjalnej rakotwórczości, wskaże organy docelowe i możliwość akumulacji. Badanie może także dostarczyć szacunkowych informacji na temat poziomu dawkowania, przy którym nie obserwuje się szkodliwych zmian w kontekście skutków toksycznych oraz, w przypadku niegenotoksycznych substancji rakotwórczych, w odniesieniu do reakcji guzów, które to informacje można wykorzystać do ustalenia kryteriów bezpieczeństwa dla narażenia ludzi. Podkreśla się również konieczność uważnych obserwacji klinicznych zwierząt, aby uzyskać możliwie jak najwięcej informacji.
6. Cele badań toksyczności przewlekłej/rakotwórczości w ramach niniejszej metody badawczej obejmują:
 - określenie właściwości rakotwórczych substancji badanej, skutkujących zwiększonym występowaniem nowotworów, zwiększonym odsetkiem nowotworów złośliwych lub szybszym wystąpieniem nowotworów, w porównaniu z równoległymi grupami kontrolnymi,
 - określenie czasu, po którego upływie pojawiają się nowotwory,
 - określenie toksyczności przewlekłej substancji badanej,

- określenie organu lub organów docelowych toksyczności przewlekłej i rakotwórczości,
- scharakteryzowanie zależności dawka-odpowiedź,
- określenie poziomu dawkowania, przy którym nie obserwuje się szkodliwych zmian (NOAEL) lub punktu wyjścia dla ustalenia dawki wyznaczającej (BMD),
- ekstrapolacja skutków rakotwórczych do poziomów narażenia ludzi przy niskich dawkach,
- oszacowanie skutków toksyczności przewlekłej do poziomów narażenia ludzi,
- pozyskanie danych do zbadania hipotez dotyczących sposobu działania (2) (7) (12) (13) (14) (15).

WSTĘPNE ROZWAŻANIA

7. Podczas oceny i oszacowania potencjalnej rakotwórczości i toksyczności przewlekłej substancji badanej laboratorium badawcze powinno rozważyć wszystkie dostępne informacje na temat substancji badanej przed rozpoczęciem badania, w celu opracowania takiego projektu badania, który umożliwi zbadanie toksykologicznych właściwości w sposób bardziej efektywny oraz zminimalizuje wykorzystanie zwierząt. Szczególnie istotne są informacje na temat sposobu działania substancji, co do której podejrzewa się, że jest substancją rakotwórczą, oraz uwzględnienie takiego sposobu działania (2) (7) (12) (13) (14) (15), ponieważ optymalny projekt badania może różnić się w zależności od tego, czy substancja badana jest znaną genotoksyczną substancją rakotwórczą czy też substancją, co do której podejrzewa się działanie genotoksyczne i rakotwórcze. Dalsze wytyczne na temat kwestii dotyczących sposobu działania można znaleźć w wytycznych nr 116 (7).
8. Informacje, które będą pomocne w opracowywaniu projektu badania obejmują tożsamość, strukturę chemiczną i właściwości fizykochemiczne substancji badanej; wszelkie informacje na temat sposobu działania; wyniki wszelkich badań toksyczności *in vitro* lub *in vivo*, w tym badań genotoksyczności; spodziewane zastosowania i potencjalne narażenie ludzi; dostępne dane dotyczące (Q)SAR, mutagenności/genotoksyczności, rakotwórczości oraz inne dane toksykologiczne dotyczące strukturalnie powiązanych związków; dostępne dane toksykokinetyczne (jeśli dostępne, dane dotyczące kinetyki jednorazowego podania i podania powtórzonego) oraz dane pochodzące z innych badań narażenia powtarzanego. Ocenę toksyczności przewlekłej/rakotwórczości należy przeprowadzić wyłącznie po uzyskaniu wstępnych informacji na temat toksyczności na podstawie 28-dniowych lub 90-dniowych badań toksyczności wywołanej powtarzanym dawkowaniem. Użytecznych informacji mogą dostarczyć także krótkoterminowe badania dotyczące inicjacji i promocji w kontekście rakotwórczości. W kontekście badania rakotwórczości należy rozważyć podejście oparte na etapach, w ramach ogólnej oceny potencjalnych niepożądanych skutków dla zdrowia wywoływanych przez daną substancję badaną (16) (17) (18) (19).
9. Metody statystyczne najbardziej odpowiednie do analizy wyników, przy uwzględnieniu projektu doświadczenia i celów badania, należy ustalić przed rozpoczęciem badania. Wśród kwestii, jakie należy rozważyć, znajduje się pytanie, czy dane statystyczne powinny zawierać korektę uwzględniającą zwierzęta, które przeżyły, analizę łącznego ryzyka wystąpienia guza w odniesieniu do okresu przeżycia, analizę tego, jak szybko wystąpił guz, oraz analizę w przypadku przedwczesnego uśmiercenia jednej grupy lub większej liczby grup. Wytyczne dotyczące odpowiednich analiz statystycznych i kluczowych odniesień do uznanych na świecie metod statystycznych zawarto w wytycznych nr 116 (7), a także wytycznych nr 35 dotyczących analizy i ewaluacji badań toksyczności przewlekłej i rakotwórczości (20).
10. Podczas przeprowadzania badania rakotwórczości należy w każdym przypadku kierować się głównymi zasadami i rozważaniami przedstawionymi w wytycznych OECD dotyczących rozpoznawania, oceny i stosowania objawów klinicznych jako humanitarnego punktu końcowego w odniesieniu do zwierząt wykorzystanych w badaniu oceny bezpieczeństwa (21), a zwłaszcza w wytycznych zawartych w pkt 62 tego dokumentu. Punkt ten stanowi, że: *»W badaniach z zastosowaniem powtarzanego dawkowania, jeśli zwierzę wykazuje objawy kliniczne, które postępują, prowadząc do dalszego pogorszenia jego stanu, należy podjąć uzasadnioną decyzję na temat tego, czy w sposób humanitarny uśmiercić takie zwierzę. Taka decyzja powinna opierać się na rozważeniu wartości informacji, jakie można uzyskać dzięki dalszemu utrzymywaniu takiego zwierzęcia w ramach badania i uwzględnić ogólny stan takiego zwierzęcia. Jeśli zapadnie decyzja o pozostawieniu takiego zwierzęcia w badaniu, częstotliwość obserwacji należy w razie potrzeby zwiększyć. Można także tymczasowo zaprzestać dawkowania, jeśli nie wpłynie to w sposób niekorzystny na cel badania, a zmniejszy cierpienie lub stres odczuwany przez zwierzę, lub też można zmniejszyć podawaną dawkę.*
11. Szczegółowe wytyczne dotyczące zasad doboru dawek w przypadku badań toksyczności przewlekłej i rakotwórczości, a także omówienie takich zasad, można znaleźć w wytycznych nr 116 (7), oraz w publikacjach Międzynarodowego Instytutu Nauk Biologicznych (ILSI) (22) (23). Główna strategia doboru dawek zależy od głównego celu lub celów badania (pkt 6). Podczas doboru odpowiednich poziomów dawek należy zachować równowagę między kontrolą zagrożenia a określeniem reakcji na niskie dawki i ich istotnością. Ma to szczególne znaczenie w przypadku łącznego badania toksyczności przewlekłej i rakotwórczości.

12. Należy rozważyć przeprowadzenie niniejszego łączonego badania toksyczności przewlekłej i rakotwórczości zamiast przeprowadzania osobno badania toksyczności przewlekłej (rozdział B.30 niniejszego załącznika) i badania rakotwórczości (rozdział B.32 niniejszego załącznika). W porównaniu z przeprowadzaniem dwóch osobnych badań łączone badanie zapewnia większą efektywność pod względem czasu i kosztów, a jednocześnie nie obniża jakości danych, czy to na etapie badania toksyczności przewlekłej, czy też na etapie badania rakotwórczości. Przy przeprowadzaniu łączonego badania toksyczności przewlekłej i rakotwórczości należy jednak zwrócić szczególną uwagę na zasady doboru dawek (pkt 11 i 22–26), a także uznać się, że w przypadku pewnych ram regulacyjnych wymagane może być przeprowadzenie takich badań osobno. Dalsze wytyczne dotyczące projektu łączonego badania toksyczności przewlekłej i rakotwórczości umożliwiającego osiągnięcie maksymalnej efektywności badania pod względem ograniczenia liczby wykorzystanych zwierząt, a także poprzez usprawnienie różnych procedur doświadczalnych, można znaleźć w wytycznych nr 116 (7).
13. Definicje stosowane w kontekście niniejszej metody badawczej można znaleźć na końcu tego rozdziału oraz w wytycznych nr 116 (7).

ZASADA BADANIA

14. Układ badania obejmuje dwa równoległe etapy – etap badania toksyczności przewlekłej i etap badania rakotwórczości (w celu uzyskania informacji na temat czasu trwania etapów zob. odpowiednio pkt 34 i 35). Substancję badaną podaje się zazwyczaj drogą pokarmową, choć w niektórych przypadkach właściwe może być badanie z zastosowaniem drogi inhalacyjnej lub dermalnej. Na etapie badania toksyczności przewlekłej substancję badaną podaje się codziennie w dawkach stopniowanych kilku grupom badanych zwierząt, przy czym każda grupa otrzymuje inny poziom dawki, zazwyczaj przez okres 12 miesięcy, choć w zależności od wymogów regulacyjnych można wybrać także dłuższy lub krótszy czas trwania tego etapu badania (zob. pkt 34). Czas trwania wybiera się w taki sposób, by badanie było dostatecznie długie, aby umożliwić widoczne pojawienie się wszelkich skumulowanych skutków toksyczności, jednocześnie unikając mogących wprowadzić w błąd skutków zmian wynikających z wieku. Układ badania może obejmować także uśmiercanie w trakcie trwania doświadczenia, np. po upływie 3 i 6 miesięcy, a także dodatkowe grupy zwierząt w celu umożliwienia takiego działania (zob. pkt 20). Na etapie badania rakotwórczości substancję badaną podaje się codziennie kilku grupom badanych zwierząt, przez większą część długości ich życia. Podczas obydwu etapów zwierzęta obserwuje się uważnie w celu wykrycia objawów toksyczności i pojawienia się zmian nowotworowych. Zwierzęta, które zginą lub zostaną uśmiercone podczas badania, są poddawane sekcji zwłok, a zwierzęta, które przeżyją, są, po zakończeniu badania, uśmiercane i poddawane sekcji zwłok.

OPIS METODY

Wybór gatunku zwierząt

15. Niniejsza metoda badawcza obejmuje przede wszystkim ocenę i oszacowanie toksyczności przewlekłej i rakotwórczości u gryzoni (pkt 2). Wykorzystanie gatunków innych niż gryzonia można rozważyć, jeśli dostępne dane wskazują, że takie gatunki są bardziej odpowiednie w kontekście określenia skutków dla zdrowia u ludzi. Wybór gatunku należy uzasadnić. Preferowanym gatunkiem gryzoni jest szczur, można jednak wykorzystać także inne gatunki, np. mysz. Choć w przeszłości wykorzystanie myszy w badaniach rakotwórczości mogło ograniczać użyteczność takich badań (24) (25) (26), w ramach niektórych obowiązujących przepisów nadal wymaga się badania rakotwórczości z wykorzystaniem myszy, o ile nie ustalono, że takie badanie nie jest konieczne z naukowego punktu widzenia. Szczury i myszy są jak dotąd preferowanymi modelami doświadczalnymi z uwagi na ich względnie krótką długość życia, powszechne wykorzystywanie w badaniach farmakologicznych i toksykologicznych, podatność na powstawanie guzów, a także dostępność dostatecznie scharakteryzowanych szczepów. Z racji tych cech dostępne są znaczne ilości informacji na temat ich fizjologii i patologii. Projekt i przeprowadzenie badań toksyczności przewlekłej/rakotwórczości z wykorzystaniem gatunków innych niż gryzonia, jeśli jest to wymagane, powinny opierać się na zasadach określonych w niniejszej metodzie badawczej, a także na zasadach określonych w rozdziale B.27 niniejszego załącznika, dotyczącym 90-dniowego badania toksyczności pokarmowej wywołanej powtarzanym dawkowaniem z wykorzystaniem gatunków innych niż gryzonia (6). Dodatkowe informacje dotyczące wyboru gatunku i szczepu przedstawiono w wytycznych nr 116 (7).
16. Zaleca się wykorzystanie zdrowych, młodych, dorosłych zwierząt pochodzących ze szczepów powszechnie wykorzystywanych w laboratoriach. Badanie toksyczności przewlekłej/rakotwórczości należy przeprowadzić z wykorzystaniem zwierząt z tego samego szczepu i źródła, z którego pochodziły zwierzęta wykorzystane we wstępnym badaniu lub wstępnych badaniach toksyczności o krótszym czasie trwania, niemniej jednak, jeśli wiadomo, że w przypadku zwierząt z danego szczepu i źródła pojawiają się problemy z osiągnięciem powszechnie przyjętego kryterium przeżycia w badaniach długoterminowych [zob. wytyczne nr 116 (7)], należy rozważyć wykorzystanie szczepu zwierząt, który charakteryzuje się akceptowalnym wskaźnikiem przeżycia w przypadku badań długoterminowych. Samice powinny być nieródkami i nie mogą być w ciąży.

Warunki przetrzymywania i karmienia

17. Zwierzęta można przetrzymywać pojedynczo lub też w klatkach w małych grupach składających się z osobników tej samej płci; przetrzymywanie zwierząt pojedynczo należy rozważyć, wyłącznie jeśli jest to uzasadnione z naukowego punktu widzenia (27) (28) (29). Klatki należy rozmieścić w taki sposób, aby zminimalizować potencjalny wpływ ich układu. Temperatura w pomieszczeniach badawczych, w których przetrzymuje się zwierzęta, powinna wynosić 22 °C (± 3 °C). Chociaż wilgotność względna powinna wynosić co najmniej 30 % i pożądana jest, by poza czasem czyszczenia pomieszczenia nie przekraczała 70 %, należy dążyć do utrzymania jej na poziomie 50–60 %. Oświetlenie powinno być sztuczne, w cyklu 12 godzin światła, 12 godzin ciemności. Do karmienia można stosować konwencjonalne pasze laboratoryjne z nieograniczonym dostępem do wody pitnej. Pasza powinna spełniać wszystkie wymogi związane z odżywianiem badanych gatunków, a obecna w niej zawartość pokarmowych substancji zanieczyszczających, w tym między innymi pozostałości pestycydów, trwałych zanieczyszczeń organicznych, fitoestrogenów, metali ciężkich i mikotoksyn, które mogą wpłynąć na wynik badania, powinna być możliwie jak najniższa. Okresowo należy generować informacje

analityczne na temat poziomów składników odżywczych i pokarmowych substancji zanieczyszczających, a przynajmniej na początku badania oraz w przypadku zmiany stosowanej partii. Takie informacje należy uwzględnić w sprawozdaniu końcowym. Informacje analityczne na temat wody pitnej stosowanej w badaniu należy przedstawić w podobny sposób. Na wybór pokarmu może mieć wpływ potrzeba zapewnienia odpowiedniej mieszanki substancji badanej, a także potrzeba spełnienia wymogów związanych z odżywianiem zwierząt, jeśli substancję badaną podaje się wraz z pokarmem.

Przygotowanie zwierząt

18. Należy wykorzystać zdrowe zwierzęta aklimatyzowane do warunków laboratoryjnych przez okres co najmniej 7 dni oraz niepoddawane wcześniej procedurom badawczym. W przypadku gryzoni dawkowanie substancji zwierzętom należy rozpocząć możliwie jak najszybciej po odsadzeniu i aklimatyzacji oraz najlepiej, zanim zwierzęta osiągną wiek 8 tygodni. Badane zwierzęta należy scharakteryzować ze względu na ich gatunek, szczep, źródło, płeć, wagę i wiek. W chwili rozpoczęcia badania odchylenia masy dla obu płci wykorzystanych zwierząt powinny być minimalne i nie przekraczać $\pm 20\%$ średniej masy wszystkich zwierząt wykorzystanych w ramach badania, osobno dla każdej płci. Należy losowo przydzielić zwierzęta do grup kontrolnych i grup poddawanych działaniu substancji badanej. Po randomizacji między grupami nie powinno być znaczących różnic w średniej wadze osobników, w odniesieniu do obu płci. Jeśli odnotowano statystycznie istotne różnice, randomizację należy powtórzyć, jeśli jest to możliwe. Każdemu zwierzęciu należy przydzielić niepowtarzalny numer identyfikacyjny i w sposób stały oznaczyć je tym numerem poprzez jego wytatuowanie, wszczepienie implantu z chipem lub za pomocą innej odpowiedniej metody.

PROCEDURA

Liczba i płeć zwierząt

19. Należy wykorzystać zwierzęta obu płci. Należy wykorzystać wystarczającą liczbę zwierząt, aby umożliwić szczegółowe szacunki z punktu widzenia biologicznego i statystycznego. W związku z powyższym w przypadku gryzoni każda grupa otrzymująca dawki (jak określono to w pkt 22) oraz równoległa grupa kontrolna przeznaczone do etapu badania rakotwórczości powinny liczyć co najmniej 50 zwierząt każdej płci. W zależności od celu badania można zwiększyć moc statystyczną kluczowych szacunków poprzez zróżnicowane przydzielenie zwierząt nierównomiernie do grup otrzymujących różne dawki, przy czym w grupach otrzymujących niskie dawki powinno być więcej niż 50 zwierząt; np. w celu oszacowania rakotwórczości przy niskich dawkach. Należy jednak pamiętać, że umiarkowane zwiększenie liczebności grupy oznacza względnie niewielkie zwiększenie mocy statystycznej badania. W przypadku gryzoni każda grupa otrzymująca dawki (jak określono to w pkt 22) oraz równoległa grupa kontrolna przeznaczone do etapu badania toksyczności przewlekłej powinny liczyć co najmniej 10 zwierząt każdej płci. Należy zauważyć, że liczba ta jest niższa niż liczba określona dla badania toksyczności przewlekłej (rozdział B.30 niniejszego załącznika). Przy interpretacji danych pochodzących od zmniejszonej liczby zwierząt w grupie na etapie badania toksyczności przewlekłej w ramach takiego łączonego badania można jednak posłużyć się danymi pochodzącymi od większej liczby zwierząt przewidzianych w ramach etapu badania rakotwórczości. W przypadku badań z wykorzystaniem myszy na etapie badania toksyczności przewlekłej może zaistnieć konieczność dodania zwierząt do każdej z grup otrzymujących dawki, w celu przeprowadzenia wszystkich wymaganych oznaczeń hematologicznych. Więcej informacji na temat projektu badania pod względem statystycznym oraz doboru poziomów dawek w celu zmaksymalizowania mocy statystycznej zawarto w wytycznych nr 116 (7).

Ustalenia dotyczące uśmiercania w trakcie trwania doświadczenia oraz grup satelitarnych (wskaźnikowych)

20. W ramach badania można założyć uśmiercanie zwierząt w trakcie trwania doświadczenia, np. po upływie 6 miesięcy w przypadku etapu badania toksyczności przewlekłej, w celu uzyskania informacji na temat progresji zmian innych niż nowotworowe oraz informacji dotyczących mechanizmu działania, jeśli jest to uzasadnione z naukowego punktu widzenia. Jeśli takie informacje są już dostępne dzięki poprzednim badaniom toksyczności wywołanej powtarzaniem dawkowaniem substancji badanej, uśmiercanie w trakcie trwania doświadczenia może nie być uzasadnione z naukowego punktu widzenia. Zwierzęta wykorzystane na etapie badania toksyczności przewlekłej, który trwa zazwyczaj 12 miesięcy (pkt 34), dostarczają danych dotyczących uśmiercania w trakcie trwania doświadczenia przydatnych w kontekście etapu badania rakotwórczości, dzięki czemu ogranicza się całkowitą liczbę wykorzystanych zwierząt. Na etapie badania toksyczności przewlekłej można uwzględnić także grupy satelitarne, w celu monitorowania odwracalności zmian toksykologicznych wywołanych substancją badaną. Wprowadzenie takich grup można ograniczyć do najwyższego poziomu dawki stosowanego w badaniu oraz grupy kontrolnej. W celu monitorowania w trakcie badania, w razie konieczności, statusu choroby, można uwzględnić dodatkową grupę zwierząt wskaźnikowych (zazwyczaj 5 zwierząt każdej płci) (30). Dalsze wytyczne dotyczące projektu badania uwzględniającego uśmiercanie w trakcie trwania doświadczenia, zwierzęta satelitarne i wskaźnikowe w celu zminimalizowania całkowitej liczby wykorzystanych zwierząt przedstawiono w wytycznych nr 116 (7).
21. Jeśli projekt badania przewiduje wykorzystanie zwierząt satelitarnych lub uśmiercanie w trakcie trwania doświadczenia, liczba zwierząt w każdej grupie otrzymującej dawki przewidziana w tym celu będzie wynosić zazwyczaj 10 zwierząt każdej płci, zaś całkowitą liczbę zwierząt przewidzianych w układzie badania należy zwiększyć o liczbę zwierząt przeznaczonych do uśmiercania przed zakończeniem badania. Zwierzęta przewidziane do uśmiercania w trakcie trwania doświadczenia lub zwierzęta satelitarne zazwyczaj poddaje się takim samym obserwacjom, w tym obserwacjom dotyczącym masy ciała, spożycia pokarmu/wody, pomiarom hematologicznym i pod kątem biochemii klinicznej oraz pod kątem patologii, co zwierzęta wykorzystane w ramach głównego badania na etapie badania toksyczności przewlekłej, choć można założyć (w przypadku grup przewidzianych do uśmiercania w trakcie trwania doświadczenia) ograniczenie takich pomiarów do konkretnych kluczowych działań, takich jak badanie neurotoksyczności lub immunotoksyczności.

Grupy otrzymujące dawki oraz dawkowanie

22. Wytyczne dotyczące wszystkich aspektów doboru dawek oraz zróżnicowania poziomu dawek zawarto w wytycznych nr 116 (7). Należy zastosować co najmniej trzy poziomy dawek oraz ustanowić równoległą grupę kontrolną, zarówno dla etapu badania toksyczności przewlekłej, jak i dla etapu badania rakotwórczości. Poziomy dawek będą zazwyczaj oparte na wynikach krótkoterminowych badań z powtarzaniem dawkowaniem lub badań ustalających zakres dawkowania oraz należy uwzględnić w tym kontekście wszelkie istniejące dane toksykologiczne i toksykokinetyczne dostępne w odniesieniu do substancji badanej lub substancji powiązanych.

23. W przypadku etapu badania toksyczności przewlekłej pełne badanie z zastosowaniem trzech poziomów dawek może zostać uznane za zbędne, jeśli możliwe jest założenie, że badanie z zastosowaniem jednego poziomu dawki, równego co najmniej 1 000 mg/kg masy ciała dziennie, nie spowoduje szkodliwych skutków. Takie założenie powinno opierać się na informacjach pochodzących z badań wstępnych oraz określeniu, że na podstawie danych dotyczących innych strukturalnie powiązanych związków nie przewiduje się toksyczności. Można zastosować limit 1 000 mg/kg masy ciała dziennie, z wyjątkiem sytuacji, gdy narażenie ludzi wskazuje potrzebę zastosowania wyższego poziomu dawki.
24. O ile nie ogranicza tego fizykochemiczny charakter biologicznych skutków działania substancji badanej, należy wybrać najwyższy poziom dawki w celu określenia głównych organów docelowych oraz skutków toksycznych, jednocześnie unikając cierpienia, toksyczności ostrej, chorobowości lub śmierci. Należy wybrać najwyższy poziom dawki w celu uzyskania dowodów na toksyczność, potwierdzonych, na przykład, wolniejszym przybieraniem na wadze (o około 10 %). W zależności od celów badania (zob. pkt 6) można jednak wybrać górną dawkę niższą od dawki potwierdzającej toksyczność, np. jeśli dawka powoduje niekorzystny skutek istotny dla badania, który ma jednak niewielki wpływ na długość życia czy masę ciała.
25. Poziomy dawek i zróżnicowanie ich poziomów można dobrać tak, by określić odpowiedź zależną od dawki oraz, w zależności od sposobu działania substancji badanej, NOAEL lub inny pożądany wynik badania, np. BMD (zob. pkt 27). Przy stosowaniu niższych dawek należy rozważyć takie czynniki, jak spodziewane nachylenie krzywej dawka-odpowiedź, dawki, przy których mogą pojawić się istotne zmiany w metabolizmie, lub charakter działania toksycznego, przy którym oczekuje się wartości granicznej lub punktu wyjścia dla ekstrapolacji dla niskiej dawki. Przy przeprowadzaniu łączonego badania rakotwórczości/toksyczności przewlekłej głównym celem będzie uzyskanie informacji koniecznych do oceny ryzyka wystąpienia rakotwórczości, zaś informacje dotyczące toksyczności przewlekłej będą zazwyczaj stanowić cel drugorzędny. Należy o tym pamiętać przy doborze poziomów dawek oraz zróżnicowania poziomów dawek na potrzeby badania.
26. Wybrane zróżnicowanie poziomów dawki będzie zależeć od celów badania i właściwości substancji badanej i nie może zostać z góry szczegółowo określone w niniejszej metodzie badawczej, jednak zastosowanie dwóch do czterech odstępów pomiędzy kolejnym dawkowaniem często zapewnia dobre wyniki badania dla ustalenia malejących poziomów dawki, a dodanie czwartej grupy badanej jest często rozwiązaniem preferowanym w porównaniu ze stosowaniem bardzo dużych interwałów między dawkowaniem (np. współczynnik większy niż 6-10). Zasadniczo należy unikać stosowania współczynników większych niż 10, a w przypadku ich zastosowania należy je uzasadnić.
27. Jak omówiono to w wytycznych OECD nr 116 (7), kwestie, jakie należy rozważyć przy doborze dawki, obejmują:
- znane lub podejrzewane nieliniowości lub punkty przegięcia krzywej dawka-odpowiedź,
 - toksykokinetykę oraz zakresy dawkowania, przy których występuje lub nie występuje indukcja metaboliczna, nasycecie lub też nieliniowość między zewnętrznymi a wewnętrznymi dawkami,
 - zmiany prekursorowe, markery skutku, lub wskaźniki działania kluczowych podstawowych procesów biologicznych,
 - kluczowe (lub podejrzewane) aspekty sposobu działania, takie jak dawki, przy których zaczyna pojawiać się cytotoksyczność, zakłócone zostają poziomy hormonów, przestają działać mechanizmy homeostatyczne itp.,
 - regiony krzywej dawka-odpowiedź, gdzie konieczne są szczególnie solidne szacunki, np. w zakresie spodziewanej BMD lub podejrzewanej wartości granicznej,
 - spodziewane poziomy narażenia ludzi, zwłaszcza przy doborze dawek średnich i niskich.
28. Grupa kontrolna powinna być grupą niepoddawaną działaniu substancji badanej lub grupą kontrolną nośnika, jeśli do podawania substancji badanej zastosowano nośnik. Z wyjątkiem poddawania działaniu substancji badanej, zwierzęta z grupy kontrolnej należy traktować w sposób identyczny ze sposobem traktowania osobników z grup badanych. Jeśli zastosowano nośnik, grupa kontrolna otrzymuje nośnik w najwyższej objętości stosowanej wśród grup otrzymujących dawki. Jeśli substancję badaną podaje się wraz z pokarmem i jeśli powoduje ona znacznie zmniejszone pobranie pokarmu z powodu jego obniżonych wartości smakowych, pomocna może być dodatkowa grupa kontrolna zwierząt otrzymujących pokarm w ilości spożywanej przez zwierzęta z grupy badanej (pair-fed), która zapewni odpowiedniejszą kontrolę.

Przygotowanie dawek i podanie substancji badanej

29. Substancję badaną zazwyczaj podaje się drogą pokarmową, wraz z pokarmem lub wodą pitną, lub też za pomocą sondy. Dodatkowe informacje na temat dróg i metod podania przedstawiono w wytycznych nr 116 (7). Droga i metoda podania zależą od celu badania, fizykochemicznych właściwości substancji badanej, jej biodostępności oraz głównej drogi i metody narażenia ludzi. Należy przedstawić uzasadnienie wybranej drogi i metody podania. W trosce o dobrostan zwierząt należy w normalnych warunkach wybrać sondę żołądkową wyłącznie dla tych substancji, dla których taka droga i metoda podania w sposób uzasadniony odzwierciedlają potencjalne narażenie ludzi (np. produkty farmaceutyczne). Substancje występujące w pokarmie lub środowisku

naturalnym, w tym pestycydy, podaje się zazwyczaj wraz z pokarmem lub wodą pitną. W przypadku jednak niektórych scenariuszy, np. narażenia zawodowego, podawanie substancji za pomocą innych dróg może być bardziej właściwe.

30. W razie potrzeby substancję badaną rozpuszcza się lub sporządza się jej zawiesinę w odpowiednim nośniku. W stosownych przypadkach należy wziąć pod uwagę następujące cechy nośnika i innych dodatków: wpływ na wchłanianie, dystrybucję, metabolizm oraz zatrzymywanie substancji badanej; wpływ na chemiczne własności substancji badanej, które mogą zmienić jej charakterystykę toksyczną; oraz wpływ na spożycie pokarmu lub wody, lub też na stan odżywienia zwierząt. Zaleca się, w miarę możliwości, najpierw rozważyć zastosowanie roztworu wodnego/zawiesiny, następnie roztworu/emulsji w oleju (np. z zastosowaniem oleju kukurydzianego), a potem możliwego roztworu w innych nośnikach. W przypadku nośników innych niż woda charakterystyka toksyczna nośnika powinna być znana. Dostępne powinny być także informacje na temat stabilności substancji badanej oraz jednorodności roztworów dawek lub pokarmu z dawkami (w zależności od sytuacji) w warunkach podawania (np. pokarm).
31. W przypadku substancji podawanych w pokarmie lub wodzie pitnej ważne jest dopilnowanie, by takie ilości substancji badanej nie zakłócały prawidłowej równowagi odżywiania lub spożycia wody. W przypadku długoterminowych badań toksyczności z zastosowaniem podawania dawek wraz z pokarmem stężenie substancji badanej w paszy nie powinno w normalnych warunkach przekraczać górnego limitu 5 % całego pokarmu, aby uniknąć zakłócenia równowagi odżywiania. Przy podawaniu substancji badanej wraz z pokarmem można zastosować stałe stężenie w pokarmie (mg/kg pokarmu lub ppm) lub też stały poziom dawki w odniesieniu do masy ciała zwierzęcia (mg/kg masy ciała), obliczany cotygodniowo. Należy określić, które rozwiązanie zastosowano.
32. Przy podawaniu substancji drogą pokarmową zwierzętom podaje się dawki substancji badanej codziennie (siedem dni w tygodniu), przez okres 12 miesięcy (etap badania toksyczności przewlekłej) lub 24 miesięcy (etap badania rakotwórczości), zob. także pkt 33 i 34. Zastosowanie innego systemu dawkowania, np. przez pięć dni w tygodniu, należy uzasadnić. Przy podawaniu substancji drogą dermalną zwierzęta zazwyczaj poddaje się działaniu substancji badanej przez co najmniej 6 godzin dziennie, 7 dni w tygodniu, zgodnie z rozdziałem B.9 niniejszego załącznika (11), przez okres 12 miesięcy (etap badania toksyczności przewlekłej) lub 24 miesięcy (etap badania rakotwórczości). Narażenie drogą inhalacyjną stosuje się przez 6 godzin dziennie, 7 dni w tygodniu, ale możliwe jest zastosowanie narażenia także przez 5 dni w tygodniu, jeśli zostanie to uzasadnione. Okres narażenia zazwyczaj wynosi 12 miesięcy (etap badania toksyczności przewlekłej) lub 24 miesiące (etap badania rakotwórczości). Jeśli gatunki gryzoni inne niż szczury poddaje się narażeniu wyłącznie poprzez nos, maksymalne okresy narażenia można dostosować tak, by zminimalizować charakterystyczny dla danego gatunku stres. W przypadku stosowania okresu narażenia krótszego niż 6 godzin dziennie należy przedstawić stosowne uzasadnienie. Zob. również rozdział B.8 niniejszego załącznika (9).
33. Jeśli substancję badaną podaje się zwierzętom za pomocą sondy, należy dokonywać tego z użyciem sondy żołądkowej lub odpowiedniej kaniuli intubacyjnej, każdego dnia o podobnych porach. Zazwyczaj podaje się pojedynczą dawkę raz dziennie, jeśli jednak substancja jest, na przykład, substancją wykazującą miejscowe działanie drażniące, możliwe jest zachowanie dziennej mocy dawki poprzez podawanie jej jako dawki dzielonej (dwa razy dziennie). Maksymalna objętość cieczy, jaką można podać jednorazowo, zależy od wielkości badanego zwierzęcia. Objętość taka powinna być możliwie jak najniższa i nie powinna w normalnych warunkach przekraczać 1 ml/100 g masy ciała w przypadku gryzoni (31). Zmienność stosowanej objętości należy zminimalizować poprzez dostosowanie stężenia, aby zapewnić stałą objętość przy wszystkich poziomach dawek. Wyjątkiem są substancje potencjalnie żrące lub wykazujące działanie drażniące, które należy rozcieńczyć w celu uniknięcia miejscowych ostrych skutków. Należy unikać badania z użyciem stężeń, które mogą być żrące lub wykazywać działanie drażniące dla przewodu pokarmowego.

Czas trwania badania

34. Okres dawkowania i czas trwania etapu badania toksyczności przewlekłej w ramach badania łączonego wynoszą zazwyczaj 12 miesięcy, choć w ramach projektu badania można zaplanować i zastosować krótszy (wynoszący np. 6 lub 9 miesięcy) lub dłuższy (wynoszący np. 18 lub 24 miesiące) czas trwania badania, w zależności od wymogów poszczególnych systemów regulacyjnych lub w przypadku specyficznych celów związanych z mechanizmami. Odstępstwa od 12-miesięcznego czasu trwania narażenia należy uzasadnić, zwłaszcza w przypadku krótszych okresów. Badanie na wszystkich grupach otrzymujących dawki przydzielonych do tego etapu zostanie zakończone w wyznaczonym czasie w celu oceny toksyczności przewlekłej oraz zmian patologicznych innych niż nowotworowe. Grupy satelitarne wprowadzone w celu monitorowania odwracalności zmian toksykologicznych wywołanych przez substancję badaną należy utrzymać bez dawkowania przez okres nie krótszy niż 4 tygodnie oraz nie dłuższy niż jedna trzecia całego okresu trwania badania po ustaniu narażenia.
35. W przypadku gryzoni czas trwania etapu badania rakotwórczości w ramach badania łączonego będzie zazwyczaj wynosił 24 miesiące, co stanowi większą część standardowej długości życia zwierząt, które mają zostać wykorzystane w takim badaniu. Można ustalić dłuższy lub krótszy czas trwania badania w zależności od długości życia szczepu gatunku zwierząt wykorzystanego w badaniu, taką decyzję należy jednak uzasadnić. W przypadku pewnych szczepów myszy, np. szczepów AKR/J, C3H/J lub C57BL/6J, właściwszy może być czas

trwania badania wynoszący 18 miesięcy. Poniżej znajdują się pewne wytyczne dotyczące czasu trwania badania, zakończenia badania oraz przeżycia; dalsze wytyczne, w tym rozważenia dotyczące dopuszczalności rakotwórczości ujemnie związanej z przeżyciem, przedstawiono w wytycznych nr 116 (7):

- zakończenie badania należy rozważyć, jeśli liczba osobników, które pozostały przy życiu w grupach otrzymujących niższe dawki lub grupie kontrolnej, spadnie poniżej 25 %,
- jeśli wyłącznie osobniki z grupy otrzymującej wysokie dawki padną przedwcześnie z powodu toksyczności, nie powinno to powodować zakończenia badania,
- przeżycie osobników obu płci należy rozważyć osobno,
- nie należy przedłużać badania, jeśli dane dostępne dzięki badaniu stały się niewystarczające, aby umożliwić oszacowanie wiarygodne pod względem statystycznym.

OBSERWACJE (ETAP BADANIA TOKSYCZNOŚCI PRZEWLEKŁEJ)

36. Wszystkie zwierzęta należy sprawdzić pod kątem chorobowości i upadkowości, zazwyczaj na początku i pod koniec każdego dnia, włącznie z weekendami i dniami wolnymi od pracy. Ogólnych obserwacji klinicznych należy dokonywać co najmniej raz dziennie, najlepiej o tej samej porze lub porach każdego dnia, uwzględniając szczytowy okres przewidywanych skutków po podaniu dawki w przypadku podawania substancji badanej za pomocą sondy.
37. Przynajmniej raz przed pierwszym narażeniem należy dokonać szczegółowej obserwacji klinicznej wszystkich zwierząt (w celu umożliwienia porównań dotyczących tych samych osobników), a także pod koniec pierwszego tygodnia badania, a po tym okresie – co miesiąc. Protokół dotyczący obserwacji należy opracować tak, by zminimalizować odchylenia między poszczególnymi obserwatorami i by były one niezależne od badanej grupy. Obserwacji należy dokonywać poza klatką zwierzęcia, najlepiej w warunkach standardowych i za każdym razem o podobnych porach. Obserwacje należy starannie odnotować, najlepiej za pomocą systemów punktacji wyraźnie określonych przez laboratorium badawcze. Należy dołożyć starań w celu dopilnowania, aby odchylenia w warunkach obserwacji były minimalne. Odnotowane objawy powinny obejmować, między innymi, zmiany w skórze, sierści, oczach, błonach śluzowych, wystąpienie wydzielin i wydaliny oraz aktywność autonomicznego układu nerwowego (np. łzawienie, piloerekcję, rozmiar źrenicy, niestandardowe zmiany w sposobie oddychania). Należy odnotować także zmiany w sposobie chodzenia, postawie i reakcji na dotyk, jak również obecność ruchów klonicznych lub tonicznych, zachowań stereotypowych (np. nadmierne czyszczenie się, powtarzające się krążenie w kółko) oraz dziwne zachowania (np. samookaleczanie się, chodzenie do tyłu) (32).
38. Badanie oftalmologiczne, za pomocą oftalmoskopu lub innego odpowiedniego sprzętu, należy przeprowadzić u wszystkich zwierząt przed pierwszym podaniem substancji badanej. Badanie to należy przeprowadzić także wraz z zakończeniem badania, najlepiej u wszystkich zwierząt, a co najmniej w grupach otrzymujących wysokie dawki i w grupach kontrolnych. W przypadku wykrycia zmian w oczach związanych z poddawaniem zwierząt działaniu substancji badanej należy przebadać wszystkie zwierzęta. Jeśli wyniki analizy strukturalnej lub inne informacje wskazują na toksyczność dla oczu, należy zwiększyć częstotliwość badania oczu.
39. W przypadku substancji chemicznych, dla których poprzednie 28-dniowe lub 90-dniowe badania toksyczności wywołanej powtarzanym dawkowaniem wykazały prawdopodobieństwo wywoływania działania neurotoksycznego i reaktywność na różnego typu bodźce (32) (np. bodźce słuchowe, wizualne i proprioceptywne) (33) (34) (35), przed rozpoczęciem badania oraz co 3 miesiące po rozpoczęciu badania przez okres do 12 miesięcy, a także wraz z zakończeniem badania (jeśli jego czas trwania jest dłuższy niż 12 miesięcy) można przeprowadzić ocenę siły uchwytu (36) oraz ocenę aktywności motorycznej (37). Dalsze szczegółowe informacje na temat procedur, jakie można zastosować, podano w odpowiednich odniesieniach. Można jednak także zastosować również procedury inne niż te podane w odniesieniach.
40. W przypadku substancji chemicznych, dla których poprzednie 28-dniowe lub 90-dniowe badania toksyczności wywołanej powtarzanym dawkowaniem wykazały prawdopodobieństwo wywoływania działania immunotoksycznego, dalsze badania tego parametru docelowego można przeprowadzić wraz z zakończeniem badania.

Masa ciała, spożycie pokarmu/wody i wydajność pokarmu

41. Wszystkie zwierzęta należy zważyć na początku rozpoczęcia poddawania ich działaniu substancji badanej, a także co najmniej raz w tygodniu przez pierwsze 13 tygodni, a po tym okresie – co najmniej raz w miesiącu. Pomiarów spożycia pokarmu i wydajności pokarmu należy dokonywać co najmniej raz w tygodniu przez pierwsze 13 tygodni, a po tym okresie – co najmniej raz w miesiącu. Spożycie wody należy mierzyć co najmniej raz w tygodniu przez pierwsze 13 tygodni, a po tym okresie – co najmniej raz w miesiącu, jeśli substancję badaną podaje się wraz z wodą pitną. Pomiarów spożycia wody należy rozważyć także w przypadku badań, w których zaszły zmiany związane ze spożyciem wody.

Hematologia i biochemia kliniczna

42. W przypadku badań z wykorzystaniem gryzoni badania hematologiczne należy przeprowadzać u wszystkich badanych zwierząt (10 samców i 10 samic w każdej grupie) po upływie 3, 6 i 12 miesięcy, a także wraz z zakończeniem badania (jeśli jego czas trwania jest dłuższy niż 12 miesięcy). W przypadku wykorzystania w badaniu myszy konieczne może być uwzględnienie zwierząt satelitarnych w celu przeprowadzenia wszystkich wymaganych oznaczeń hematologicznych (zob. pkt 19). W badaniach z wykorzystaniem gatunków innych niż gryzonia próbki należy pobierać od mniejszej liczby zwierząt (np. od 4 zwierząt dla każdej płci i grupy w badaniach z wykorzystaniem psów), w trakcie badania oraz wraz z jego zakończeniem, tak jak zostało to opisane w przypadku badań z wykorzystaniem gryzoni. Nie ma konieczności przeprowadzania pomiarów po upływie 3 miesięcy, zarówno w przypadku gryzoni, jak i gatunków innych niż gryzonia, jeśli w poprzednim 90-dniowym badaniu przeprowadzonym przy porównywalnych poziomach dawek nie odnotowano zmian parametrów hematologicznych. Próbkę krwi należy pobrać z określonego miejsca, na przykład poprzez nakłucie serca lub z zatoki oczodołowej tylnej, w znieczuleniu.
43. Należy zbadać parametry z następującej listy (38): całkowitą i różnicową liczbę leukocytów, liczbę erytrocytów, liczbę płytek krwi, stężenie hemoglobiny, hematokryt (HCT), średnią objętość erytrocytów (MCV), średnią masę hemoglobiny w erytrocytach (MCH), średnie stężenie hemoglobiny w erytrocytach (MCHC), czas protrombinowy oraz czas częściowej tromboplastyny po aktywacji. Inne parametry hematologiczne, takie jak ciałka Heinz'a lub inne nietypowe parametry morfologii erytrocytów lub methemoglobiny, mogą zostać zmierzone w stosownych przypadkach, w zależności od toksyczności substancji badanej. Zasadniczo należy przyjąć elastyczne podejście, dostosowane do obserwowanych lub spodziewanych skutków działania danej substancji badanej. Jeśli substancja badana ma wpływ na układ krwiotwórczy, można również przeprowadzić badanie liczby retikulocytów i cytologię szpiku kostnego, choć takie badania nie muszą być przeprowadzane w ramach badań rutynowych.
44. Oznaczenia parametrów biochemii klinicznej w celu zbadania głównych skutków toksycznych w tkankach, a w szczególności skutków dla nerek i wątroby, należy wykonać na próbkach krwi pobranych od każdego zwierzęcia (10 samców i 10 samic z każdej grupy) w takich samych odstępach czasowych jak w przypadku badań hematologicznych. W przypadku wykorzystania w badaniu myszy konieczne może być wprowadzenie zwierząt satelitarnych w celu przeprowadzenia wszystkich wymaganych oznaczeń parametrów biochemii klinicznej. W badaniach z wykorzystaniem gatunków innych niż gryzonia próbki należy pobierać od mniejszej liczby zwierząt (np. od 4 zwierząt dla każdej płci i grupy w badaniach z wykorzystaniem psów), w trakcie badania oraz wraz z jego zakończeniem, tak jak zostało to opisane w przypadku badań z wykorzystaniem gryzoni. Nie ma konieczności przeprowadzania pomiarów po upływie 3 miesięcy, zarówno w przypadku gryzoni, jak i gatunków innych niż gryzonia, jeśli w poprzednim 90-dniowym badaniu przeprowadzonym przy porównywalnych poziomach dawek nie odnotowano zmian parametrów biochemii klinicznej. Zalecane jest wstrzymanie podawania zwierzętom pokarmu (z wyjątkiem myszy) przez noc poprzedzającą pobranie krwi⁽¹⁾. Należy zbadać parametry z następującej listy (38): glukoza, mocznik (azot mocznikowy), kreatynina, białko całkowite, albumina, wapń, sód, potas, cholesterol całkowity, co najmniej dwa odpowiednie badania w celu oceny komórek wątroby (aminotransferaza alaninowa, aminotransferaza asparaginianowa, dehydrogenaza glutaminianowa, całkowite kwasy żółciowe) (39), oraz co najmniej dwa odpowiednie badania w celu oceny wątroby i dróg żółciowych (fosfataza alkaliczna, gamma-glutamylotranspeptydaza, 5'-nukleotydaza, bilirubina całkowita, całkowite kwasy żółciowe) (39). Inne parametry biochemii klinicznej, takie jak stężenie triglicerydów mierzone na czczo, poszczególne hormony oraz pseudocholinesteraza, można zbadać w stosownych przypadkach, w zależności od toksyczności substancji badanej. Zasadniczo należy przyjąć elastyczne podejście, dostosowane do obserwowanych lub spodziewanych skutków działania danej substancji badanej.
45. Oznaczenia analizy moczu należy przeprowadzić u wszystkich zwierząt wykorzystanych w badaniu (10 samców i 10 samic z każdej grupy), na próbkach pobranych w takich samych odstępach czasu jak w przypadku hematologii i biochemii klinicznej. Nie ma konieczności przeprowadzania pomiarów po upływie 3 miesięcy, jeśli w poprzednim 90-dniowym badaniu przeprowadzonym przy porównywalnych poziomach dawek nie odnotowano zmian w analizie moczu. Zalecenie eksperta dotyczące badań klinicznych pod kątem patologii obejmuje następującą listę parametrów (38): wygląd, objętość, osmolalność lub masa właściwa, pH, całkowite białko i glukoza. Inne oznaczenia obejmują ketony, urobilinogen, bilirubinę i krew utajoną. W stosownych przypadkach można zastosować badania dodatkowych parametrów w celu rozszerzenia badania zaobserwowanych skutków.
46. Ogólnie uznaje się, że podstawowe zmienne hematologiczne i biochemii klinicznej należy zbadać przed poddaniem zwierząt działaniu substancji badanej w przypadku badań z wykorzystaniem psów, jednak nie ma takiej potrzeby w przypadku badań z wykorzystaniem gryzoni (38). Jeśli jednak historyczne dane podstawowe (zob. pkt 58) są nieodpowiednie, należy rozważyć wygenerowanie takich danych.

PATOLOGIA

Pełne rozpoznanie histopatologiczne

47. Wszystkie zwierzęta wykorzystane w badaniu należy zazwyczaj poddać pełnemu, szczegółowemu rozpoznaniu histopatologicznemu, które obejmuje staranne zbadanie zewnętrznej powierzchni ciała, wszystkich otworów, jamy czaszki, jamy klatki piersiowej i jamy brzusznej oraz ich zawartości. Można jednak założyć (w grupach przewidzianych do uśmiercenia w trakcie trwania doświadczenia i w grupach satelitarnych) ograniczenie pomiarów do poszczególnych kluczowych działań, takich jak badanie neurotoksyczności lub immunotoksyczności (zob. pkt 21). Takie zwierzęta nie muszą zostać poddane rozpoznaniu histopatologicznemu ani dalszym procedurom opisanym w poniższych ustępach. Zwierzęta wskaźnikowe mogą wymagać rozpoznania histopatologicznego w zależności od poszczególnych przypadków, według uznania kierownika badania.

⁽¹⁾ W odniesieniu do niektórych pomiarów dotyczących surowicy i osocza, w szczególności dla glukozy, zaleca się wstrzymanie podawania pokarmu przez noc. Zalecenie to wynika głównie z faktu, że zwiększona zmienność, którą nieuchronnie powoduje brak wstrzymania podawania pokarmu, często maskuje bardziej subtelne skutki, co utrudnia interpretację wyników. Należy jednak zauważyć, że wstrzymanie podawania pokarmu przez noc może wpływać na ogólny metabolizm zwierząt, a w szczególności w badaniach żywieniowych może zakłócać dzienne narażenie na działanie substancji badanej. Wszystkie zwierzęta powinny zostać poddane ocenie, będąc w tym samym stanie fizjologicznym, i dlatego szczegółowe oceny lub oceny neurologiczne najlepiej zaplanować na inny dzień niż dzień pobierania próbek na potrzeby zbadania parametrów biochemii klinicznej.

48. Należy odnotować masy organów wszystkich zwierząt, prócz tych wyłączonych na mocy drugiej części pkt 47. Nadnercza, mózg, najądrza, serce, nerki, wątrobę, jajniki, śledzionę, jądra, tarczycę (zważoną po utrwaleniu, z przytarczycami) oraz macicę pobrane od wszystkich zwierząt (oprócz tych w stanie agonalnym lub uśmierconych w czasie trwania badania) należy w stosownych przypadkach okroić z wszelkich przylegających tkanek i zmierzyć ich wagę mokrą możliwie jak najszybciej po sekcji w celu zapobiegnięcia ich wyschnięciu.
49. Następujące tkanki należy zachować w roztworze utrwalającym najbardziej odpowiednim zarówno dla rodzaju tkanki, jak i planowanego późniejszego badania histopatologicznego (40) (tkanki podane w nawiasach kwadratowych są opcjonalne):

| | | | |
|---|--|---|---|
| wszystkie wyraźne zmiany | serce | trzustka | żołądek (przedżołądek, żołądek gruczołowy) |
| nadnercze | jelito kręte | przytarczyca | [zęby] |
| aorta | jelito czcze | nerw obwodowy | jądro |
| mózg (w tym części kresomózgowia, mózdzka i rdzenia/mostu) | nerka | przysadka | grasica |
| jelito ślepe | gruczoł łzowy | prostata | tarczyca |
| szyjka macicy | wątroba | odbytnica | [język] |
| gruczoł koagulujący | płuco | gruczoł ślinowy | tchawica |
| okreźnica | węzły chłonne (powierzchnowe i głębokie) | pęcherzyk nasienny | pęcherz moczowy |
| dwunastnica | gruczoł mlekowy (obowiązkowo w przypadku samic oraz, jeśli wyraźnie nadaje się do analizy, również w przypadku samców) | mięsień szkieletowy | macica (w tym szyjka macicy) |
| najądrze | [górne drogi oddechowe, w tym nos, małżowiny nosowe oraz zatoki przynosowe] | skóra | [moczowód] |
| oko (w tym siatkówka) | przełyk | rdzeń kręgowy (na trzech odcinkach: szyjnym, śródpiersiowym i lędźwiowym) | [cewka moczowa] |
| [kość udowa ze stawem] | [opuszka wężchowa] | śledziona | pochwa |
| pęcherzyk żółciowy (w przypadku gatunków innych niż szczur) | jajnik | [mostek] | odcinek szpiku kostnego lub świeżego aspiratu szpiku kostnego |
| gruczoł przyoczny | | | |

W przypadku organów parzystych, np. nerek lub nadnerczy, należy utrwalić obydwa organy. Wyniki badań klinicznych i innych badań mogą wskazać na konieczność zbadania dodatkowych tkanek. Organy uznane za prawdopodobne organy docelowe, w oparciu o znane właściwości substancji badanej, także należy zachować. W przypadku badań z zastosowaniem dermalnej drogi podania należy zbadać organy zgodnie z listą określoną dla podania drogą pokarmową, przy czym kluczowe jest pobranie i zachowanie próbek skóry z miejsca aplikacji. W przypadku badań z zastosowaniem inhalacyjnej drogi podania, układając listę tkanek z dróg oddechowych do zachowania i zbadania, należy kierować się zaleceniami zawartymi w rozdziale B.8 niniejszego załącznika (9) i B.29 niniejszego załącznika (10). W przypadku innych organów/tkanek (oraz w uzupełnieniu określonych utrwalonych tkanek z dróg oddechowych) należy zbadać organy zgodnie z listą określoną dla pokarmowej drogi podania.

Histopatologia

50. Dostępne są wytyczne dotyczące najlepszych praktyk związanych z przeprowadzaniem toksykologicznych badań zmian patologicznych (40). Należy zbadać pod kątem histopatologii co najmniej następujące tkanki:
- wszystkie tkanki zwierząt z grup otrzymujących wysokie dawki i z grup kontrolnych,

- wszystkie tkanki zwierząt w stanie agonalnym lub uśmierconych podczas badania,
- wszystkie tkanki wykazujące makroskopowe nieprawidłowości,
- tkanki docelowe lub tkanki, które wykazują zmiany spowodowane poddaniem zwierzęcia działaniu substancji badanej w grupie otrzymującej wysokie dawki, pobrane od wszystkich zwierząt we wszystkich innych grupach otrzymujących dawki,
- w przypadku organów parzystych, np. nerek lub nadnerczy, należy zbadać obydwa organy.

OBSERWACJE (ETAP BADANIA RAKOTWÓRCZOŚCI)

51. Wszystkie zwierzęta należy sprawdzić pod kątem chorobowości i upadkowości, zazwyczaj na początku i pod koniec każdego dnia, włącznie z weekendami i dniami wolnymi od pracy. Dodatkowo zwierzęta należy sprawdzać raz dziennie pod kątem szczególnych objawów istotnych z toksykologicznego punktu widzenia. W przypadku badań z wykorzystaniem sondy zwierzęta należy sprawdzać w okresie bezpośrednio po dawkowaniu. Szczególną uwagę należy zwrócić na rozwój guzów; należy odnotować czas pojawienia się guza, jego położenie, wymiary, wygląd oraz progresję każdego wyraźnie widocznego lub wyczuwalnego guza.
52. Wszystkie zwierzęta należy zważyć na początku rozpoczęcia poddawania ich działaniu substancji badanej, a także co najmniej raz w tygodniu przez pierwsze 13 tygodni, a po tym okresie – co najmniej raz w miesiącu. Pomiarów spożycia pokarmu i wydajności pokarmu należy dokonywać co najmniej raz w tygodniu przez pierwsze 13 tygodni, a po tym okresie – co najmniej raz w miesiącu. Spożycie wody należy mierzyć co najmniej raz w tygodniu przez pierwsze 13 tygodni, a po tym okresie – co najmniej raz w miesiącu, jeśli substancję badaną podaje się wraz z wodą pitną. Pomiarów spożycia wody należy rozważyć także w przypadku badań, w których zaszły zmiany związane ze spożyciem wody.

Hematologia, biochemia kliniczna i inne pomiary

53. W celu zmaksymalizowania informacji uzyskanych dzięki badaniu, zwłaszcza na temat kwestii związanych ze sposobem działania, próbki krwi można poddać analizie parametrów hematologii i biochemii klinicznej, według uznania kierownika badania. Właściwe może być także przeprowadzenie analizy moczu. Informacji na temat tych parametrów dostarczą dane dotyczące zwierząt wykorzystanych na etapie badania toksyczności przewlekłej, zazwyczaj dotyczące okresu 12 miesięcy (pkt 34). Dalsze wytyczne dotyczące wartości pobrania takich próbek w ramach badania rakotwórczości przedstawiono w wytycznych nr 116 (7). Jeśli pobiera się próbki krwi, należy pobierać je pod koniec okresu badania, tuż przed procedurą uśmiercania zwierząt lub w jej trakcie. Próbki krwi należy pobrać z określonego miejsca, na przykład poprzez nakłucie serca lub z zatoki oczodołowej tylnej, w znieczuleniu. Do zbadania można przygotować również rozmazy krwi, zwłaszcza jeśli organem docelowym wydaje się szpik kostny, choć wartość takiego badania rozmazów krwi na etapie badania rakotwórczości w celu oceny rakotwórczości/potencjału onkogenicznego została zakwestionowana (38).

PATOLOGIA

Pełne rozpoznanie histopatologiczne

54. Wszystkie zwierzęta wykorzystane w badaniu, prócz zwierząt wskaźnikowych oraz innych zwierząt satelitarnych (zob. pkt 20), należy poddać pełnemu, szczegółowemu rozpoznaniu histopatologicznemu, które obejmuje staranne zbadanie zewnętrznej powierzchni ciała, wszystkich otworów, jamy czaszki, jamy klatki piersiowej i jamy brzusznej oraz ich zawartości. Zwierzęta wskaźnikowe i inne zwierzęta satelitarne mogą wymagać rozpoznania histopatologicznego w zależności od poszczególnych przypadków, według uznania kierownika badania. Masa organów nie jest zazwyczaj częścią badania rakotwórczości, jako że w organach zachodzą zmiany związane z wiekiem, a rozwój guzów na późniejszych etapach uniemożliwia wykorzystanie takich danych. Takie dane mogą mieć jednak kluczowe znaczenie dla oszacowania wagi dowodów, w szczególności w kontekście kwestii związanych ze sposobem działania. Jeśli stanowią one część badania satelitarnego, takie dane należy zgromadzić nie później niż rok po rozpoczęciu badania.
55. Następujące tkanki należy zachować w roztworze utrwalającym najbardziej odpowiednim zarówno dla rodzaju tkanki, jak i planowanego późniejszego badania histopatologicznego (40) (tkanki podane w nawiasach kwadratowych są opcjonalne):

| | | | |
|--|---------------|---------------|--|
| wszystkie wyraźne zmiany | serce | trzustka | żołądek (przedżołądek, żołądek gruczołowy) |
| nadnercze | jelito kręte | przytarczyca | [zęby] |
| aorta | jelito czcze | nerw obwodowy | jądro |
| mózg (w tym części kresomózgowia, mózdzka i rdzenia/mostu) | nerka | przysadka | grasica |
| jelito ślepe | gruczoł łzowy | prostata | tarczyca |

| | | | |
|---|--|---|---|
| szyjka macicy | wątroba | odbytnica | [język] |
| gruczoł koagulujący | płuco | gruczoł ślinowy | tchawica |
| okrężnica | węzły chłonne (powierzchnowe i głębokie) | pęcherzyk nasienny | pęcherz moczowy |
| dwunastnica | gruczoł mlekowy (obowiązkowo w przypadku samic oraz, jeśli wyraźnie nadaje się do analizy, również w przypadku samców) | mięsień szkieletowy | macica (w tym szyjka macicy) |
| najądrze | [górne drogi oddechowe, w tym nos, małżowiny nosowe oraz zatoki przynosowe] | skóra | [moczowód] |
| oko (w tym siatkówka) | przełyk | rdzeń kręgowy (na trzech odcinkach: szyjnym, śródpiersiowym i lędźwiowym) | [cewka moczowa] |
| [kość udowa ze stawem] | [opuszka wężowa] | śledziona | pochwa |
| pęcherzyk żółciowy (w przypadku gatunków innych niż szczur) | jajnik | [mostek] | odcinek szpiku kostnego lub świeżego aspiratu szpiku kostnego |
| gruczoł przyoczny | | | |

W przypadku organów parzystych, np. nerek lub nadnerczy, należy utrwalić obydwa organy. Wyniki badań klinicznych i inne ustalenia mogą wskazać na konieczność zbadania dodatkowych tkanek. Organy uznane za prawdopodobne organy docelowe, w oparciu o znane właściwości substancji badanej, także należy zachować. W przypadku badań z zastosowaniem dermalnej drogi podania należy zbadać organy zgodnie z listą określoną dla podania drogą pokarmową, przy czym konieczne jest pobranie i zachowanie próbek skóry z miejsca aplikacji. W przypadku badań z zastosowaniem inhalacyjnej drogi podania, układając listę tkanek z dróg oddechowych do zachowania i zbadania, należy kierować się zaleceniami zawartymi w rozdziale B.8 niniejszego załącznika (8) i B.29 niniejszego załącznika (9). W przypadku innych organów/tkanek (oraz w uzupełnieniu określonych utrwalonych tkanek z dróg oddechowych) należy zbadać organy zgodnie z listą określoną dla pokarmowej drogi podania.

Histopatologia

56. Dostępne są wytyczne dotyczące najlepszych praktyk związanych z przeprowadzaniem toksykologicznych badań zmian patologicznych (40). Należy zbadać co najmniej następujące tkanki:

- wszystkie tkanki zwierząt z grup otrzymujących wysokie dawki i z grup kontrolnych,
- wszystkie tkanki zwierząt w stanie agonalnym lub uśmierconych podczas badania,
- wszystkie tkanki wykazujące makroskopowe nieprawidłowości, w tym guzy,
- w przypadku zaobserwowania w grupie otrzymującej wysoką dawkę histopatologicznych zmian związanych z poddawaniem zwierząt działaniu substancji badanej, należy zbadać takie same tkanki pochodzące od wszystkich zwierząt ze wszystkich pozostałych grup otrzymujących dawki,
- w przypadku organów parzystych, np. nerek lub nadnerczy, należy zbadać obydwa organy.

DANE ORAZ SPORZĄDZENIE SPRAWOZDANIA (RAKOTWÓRCZOŚĆ I TOKSYCZNOŚĆ PRZEWLEKŁA)

Dane

57. Należy przedstawić dane dotyczące każdego zwierzęcia, w odniesieniu do wszystkich parametrów poddawanych oszacowaniu. Dodatkowo wszystkie dane należy zestawić w postaci tabeli, przedstawiając w odniesieniu do każdej badanej grupy liczbę zwierząt na początku badania, liczbę zwierząt, które padły w trakcie trwania badania lub które uśmiercono z przyczyn humanitarnych, wraz z określeniem czasu, w którym nastąpiła śmierć lub humanitarne uśmiercenie, liczbę zwierząt wykazujących objawy toksyczności, opis obserwowanych objawów toksyczności, w tym czas ich pojawienia się, czas trwania, stopień ostrości wszelkich skutków toksycznych, liczbę zwierząt wykazujących zmiany, typ takich zmian oraz procent zwierząt wykazujących każdy typ zmiany. W tabelach z zestawieniem danych, oprócz klasyfikacji zmian, należy przedstawić średnie i odchylenia standardowe (dla danych z badań ciągłych) dotyczące zwierząt wykazujących skutki toksyczne lub zmiany.

58. Historyczne dane kontrolne mogą być cenne przy interpretacji wyników badania, np. jeśli istnieją przesłanki, że dane uzyskane z jednoczesnych kontroli są w sposób znaczący niestandardowe w porównaniu z najnowszymi danymi dotyczącymi zwierząt kontrolnych z tego samego obiektu/badanej kolonii. Historyczne dane kontrolne, jeśli poddaje się je oszacowaniu, powinny przedstawić to samo laboratorium i powinny się odnosić do zwierząt w tym samym wieku i z tego samego szczepu, oraz dane takie powinny zostać wygenerowane w ciągu pięciu lat przed rozpoczęciem rozważanego badania.
59. W stosownych przypadkach wyniki liczbowe należy poddawać oszacowaniu za pomocą właściwych i ogólnie przyjętych metod statystycznych. Metody statystyczne i dane poddawane analizie należy wybrać w czasie przygotowywania układu badania (pkt 9). Taki wybór powinien uwzględniać w razie konieczności korektę uwzględniającą zwierzęta, które przeżyły.
60. Sprawozdanie z badania musi zawierać następujące informacje:

Badana substancja chemiczna

- cechy fizyczne, czystość i własności fizykochemiczne,
- dane identyfikacyjne,
- źródło substancji chemicznej,
- numer partii,
- świadectwo analizy chemicznej.

Nośnik (w stosownych przypadkach)

- uzasadnienie wyboru nośnika (jeżeli jest inny niż woda).

Badane zwierzęta

- wykorzystany gatunek/szczep oraz uzasadnienie takiego wyboru,
- liczba, wiek i płeć zwierząt na początku badania,
- źródło, warunki przebywania, pokarm itp.,
- masa ciała poszczególnych zwierząt na początku badania.

Warunki badania

- uzasadnienie drogi podania i doboru dawek,
- w stosownych przypadkach metody statystyczne zastosowane do analizy danych,
- szczegółowe informacje na temat postaci użytkowej substancji badanej/przygotowywania pokarmu,
- dane analityczne dotyczące osiąganego stężenia, stabilności i jednorodności preparatu,
- droga podania i szczegółowe dane dotyczące podawania substancji badanej,
- w przypadku badań z inhalacyjną drogą podania informacje o tym, czy podanie odbywa się wyłącznie przez nos czy przez całe ciało,
- dawki rzeczywiste (mg/kg masy ciała/dzień), wskaźnik konwersji stężenia substancji badanej w pokarmie/ wodzie pitnej (mg/kg lub ppm) do dawki rzeczywistej, jeśli ma to zastosowanie,
- szczegółowe informacje o pokarmie i jakości wody.

Wyniki (należy przedstawić zestawienie danych w tabeli oraz dane dotyczące poszczególnych zwierząt):

Wymogi ogólne

- dane dotyczące zwierząt, które przeżyły,
- masa ciała/zmiany masy ciała,
- dane dotyczące spożycia pokarmu, wyliczenia wydajności pokarmu, jeśli przeprowadzono, oraz dane dotyczące spożycia wody, jeśli dostępne,
- dane toksykokinetyczne, jeśli dostępne,
- oftalmoskopia (jeśli takie dane są dostępne),
- hematologia (jeśli takie dane są dostępne),
- biochemia kliniczna (jeśli takie dane są dostępne).

Ustalenia badań klinicznych

- objawy toksyczności,
- występowanie (i ostrość, jeśli poddano ją ocenie) wszelkich nieprawidłowości,
- rodzaj, ostrość i czas trwania obserwowanych objawów klinicznych (tak odwracalnych, jak i nieodwracalnych).

Dane dotyczące sekcji zwłok

- masa ciała w chwili zgonu,
- masa organów i ich współczynniki, jeśli takie dane są dostępne,
- ustalenia z sekcji zwłok; występowanie i stopień ostrości nieprawidłowości.

Histopatologia

- ustalenia histopatologiczne inne niż dotyczące nowotworów,
- ustalenia histopatologiczne dotyczące nowotworów,
- korelacja między objawami makroskopowymi i mikroskopowymi,
- szczegółowy opis wszystkich ustaleń histopatologicznych związanych z poddawaniem zwierząt działaniu substancji badanej, w tym klasyfikacja ostrości skutków,
- sprawozdanie z ewentualnej wzajemnej oceny preparatów.

W stosownych przypadkach, statystyczne opracowanie wyników

Omówienie wyników, w tym:

- omówienie wszelkich podejść modelowych,
- zależność dawka-odpowiedź,
- historyczne dane kontrolne,

- rozważenie wszelkich informacji na temat sposobu działania,
- określenie BMD, NOAEL lub LOAEL,
- znaczenie dla ludzi.

Wnioski

BIBLIOGRAFIA:

- (1) OECD (1995). Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing (Rzym, 1995), wewnętrzny dokument roboczy, Dyrekcja ds. Środowiska, OECD, Paryż.
- (2) EPA (2005). Guidelines for Carcinogen Risk Assessment Risk Assessment Forum U.S. Environmental Protection Agency Waszyngton, D.C.
- (3) Combes RD, Gaunt I, Balls M (2004). A Scientific and Animal Welfare Assessment of the OECD Health Effects Test Guidelines for the Safety Testing of Chemicals under the European Union REACH System. ATLA 32: 163–208.
- (4) Barlow SM, Greig JB, Bridges JW i in. (2002). Hazard identification by methods of animal-based toxicology. Food. Chem. Toxicol. 40: 145–191.
- (5) Chhabra RS, Bucher JR, Wolfe M, Portier C (2003). Toxicity characterization of environmental chemicals by the US National Toxicology Programme: an overview. Int. J. Hyg. Environ. Health 206: 437–445.
- (6) Rozdział B.27 niniejszego załącznika. Badanie toksyczności podprzewlekłej drogą pokarmową – badanie toksyczności drogą pokarmową na gatunkach innych niż gryzonie metodą powtarzanej 90-dniowej dawki.
- (7) OECD (2012). Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 and 453 – wyd. drugie. Series on Testing and Assessment nr 116, dostępne na publicznej stronie OECD poświęconej wytycznym dotyczącym badań: www.oecd.org/env/testguidelines.
- (8) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Series on Testing and Assessment nr 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paryż.
- (9) Rozdział B.8 niniejszego załącznika. Toksyczność powtarzanej (28 dni) dawki (inhalacyjna).
- (10) Rozdział B.29 niniejszego załącznika. Badanie podprzewlekłej toksyczności inhalacyjnej – 90-dniowe badania inhalacyjne z wykorzystaniem gatunków gryzoni.
- (11) Rozdział B.9 niniejszego załącznika. Toksyczność powtarzanej (28 dni) dawki (dermalna).
- (12) Boobis AR, Cohen SM, Dellarco V, McGregor D, Meek ME, Vickers C, Willcocks D, Farland W (2006). IPCS Framework for analyzing the Relevance of a Cancer Mode of Action for Humans. Crit. Rev. Toxicol, 36: 793–801.
- (13) Cohen SM, Meek ME, Klaunig JE, Patton DE, Fenner-Crisp PA (2003). The human relevance of information on carcinogenic Modes of Action: An Overview. Crit. Rev. Toxicol. 33: 581–589.
- (14) Holsapple MP, Pitot HC, Cohen SN, Boobis AR, Klaunig JE, Pastoor T, Dellarco VL, Dragan YP (2006). Mode of Action in Relevance of Rodent Liver Tumors to Human Cancer Risk. Toxicol. Sci. 89: 51–56.
- (15) Meek EM, Bucher JR, Cohen SM, Dellarco V, Hill RN, Lehman-McKemmon LD, Longfellow DG, Pastoor T, Seed J, Patton DE (2003). A Framework for Human Relevance analysis of Information on Carcinogenic Modes of Action. Crit. Rev. Toxicol. 33: 591–653.
- (16) Carmichael NG, Barton HA, Boobis AR i in. (2006). Agricultural Chemical Safety Assessment: A Multisector Approach to the Modernization of Human Safety Requirements. Critical Reviews in Toxicology 36: 1–7.

- (17) Barton HA, Pastoor TP, Baetcke T i in. (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments. *Critical Reviews in Toxicology* 36: 9–35.
- (18) Doe JE, Boobis AR, Blacker A i in. (2006). A Tiered Approach to Systemic Toxicity Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. *Critical Reviews in Toxicology* 36: 37–68.
- (19) Cooper RL, Lamb JS, Barlow SM i in. (2006). A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. *Critical Reviews in Toxicology* 36: 69–98.
- (20) OECD (2002). Guidance Notes for Analysis and Evaluation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Series on Testing and Assessment nr 35 oraz Series on Pesticides nr 14, ENV/JM/MONO(2002)19, OECD, Paryż.
- (21) OECD (2000). Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation, Series on Testing and Assessment nr 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paryż.
- (22) Rhomberg LR, Baetcke K, Blancato J, Bus J, Cohen S, Conolly R, Dixit R, Doe J, Ekelman K, Fenner-Crisp P, Harvey P, Hattis D, Jacobs A, Jacobson-Kram D, Lewandowski T, Liteplo R, Pelkonen O, Rice J, Somers D, Turturro A, West W, Olin S (2007). Issues in the Design and Interpretation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies in Rodents: Approaches to Dose Selection *Crit Rev. Toxicol.* 37 (9): 729–837.
- (23) ILSI (Międzynarodowy Instytut Nauk Biologicznych) (1997). Principles for the Selection of Doses in Chronic Rodent Bioassays. Foran JA (red.). ILSI Press, Waszyngton, D.C.
- (24) Griffiths SA, Parkinson C, McAuslane JAN i Lumley CE (1994). The utility of the second rodent species in the carcinogenicity testing of pharmaceuticals. *The Toxicologist* 14(1): 214.
- (25) Usui T, Griffiths SA i Lumley CE (1996). The utility of the mouse for the assessment of the carcinogenic potential of pharmaceuticals. W: D'Arcy POF & Harron DWG (red.). Proceedings of the Third International Conference on Harmonisation. Queen's University Press, Belfast, s. 279–284.
- (26) Carmichael NG, Enzmann H, Pate I, Waechter F (1997). The Significance of Mouse Liver Tumor Formation for Carcinogenic Risk Assessment: Results and Conclusions from a Survey of Ten Years of Testing by the Agrochemical Industry. *Environ Health Perspect.* 105: 1196–1203.
- (27) Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady 2010/63/UE z dnia 22 września 2010 r. w sprawie ochrony zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych (Dz.U. L 276 z 20.10.2010, s. 33).
- (28) National Research Council, 1985. Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication nr 86-23. Waszyngton D.C., Departament Zdrowia i Opieki Społecznej Stanów Zjednoczonych.
- (29) GV-SOLAS (Towarzystwo Nauk o Zwierzętach Laboratoryjnych, Gesellschaft für Versuchstierkunde, grudzień 1989). Publication on the Planning and Structure of Animal Facilities for Institutes Performing Animal Experiments. ISBN 3-906255-06-9.
- (30) GV-SOLAS (Towarzystwo Nauk o Zwierzętach Laboratoryjnych, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 2006). Microbiological monitoring of laboratory animals in various housing systems.
- (31) Diehl K-H, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, Vidal J-M, van de Vorstenbosch C. (2001). A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. *Journal of Applied Toxicology* 21: 15–23.
- (32) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document nr 60.
- (33) Tupper DE, Wallace RB (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. *Acta Neurobiol. Exp.* 40: 999–1003.

-
- (34) Gad SC (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. *J. Toxicol. Environ. Health* 9: 691–704.
- (35) Moser VC, McDaniel KM, Phillips PM (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 108: 267–283.
- (36) Meyer OA, Tilson HA, Byrd WC, Riley MT (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hind-limb Grip Strength of Rats and Mice. *Neurobehav. Toxicol.* 1: 233–236.
- (37) Crofton KM, Howard JL, Moser VC, Gill MW, Reiter LW, Tilson HA, MacPhail RC (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. *Neurotoxicol. Teratol.* 13: 599–609.
- (38) Weingand K, Brown G, Hall R i in. (1996). Harmonisation of Animal Clinical Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies. *Fundam. & Appl. Toxicol.* 29: 198–201.
- (39) EMEA, projekt dokumentu pt. »Non-clinical guideline on drug-induced hepatotoxicity« (nr ref. EMEA/CHMP/SWP/a50115/2006).
- (40) Crissman JW, Goodman DG, Hildebrandt PK i in. (2004). Best Practices Guideline: Toxicological Histopathology. *Toxicologic Pathology* 32: 126–131.
-

Dodatek 1

DEFINICJA

Badana substancja chemiczna: jakakolwiek substancja lub mieszanina badana za pomocą niniejszej metody badawczej.”

7) rozdział B.36 otrzymuje brzmienie:

„B.36. TOKSYKOKINETYKA

WPROWADZENIE

1. Niniejsza metoda badawcza jest równoważna z dotyczącą badań wytyczą OECD nr 417 (2010). Badania toksykokinetyki badanej substancji chemicznej prowadzone są w celu uzyskania odpowiednich informacji na temat wchłaniania, dystrybucji, biotransformacji (tj. metabolizmu) i wydalania tej substancji, a także aby pomóc w powiązaniu stężenia lub dawki z obserwowaną toksycznością oraz w zrozumieniu mechanizmu toksyczności danej substancji. Toksykokinetyka może pomóc w zrozumieniu badań toksykologicznych poprzez wykazanie, że zwierzęta doświadczalne są systematycznie narażane na działanie badanej substancji chemicznej, oraz ujawnienie krążących grup funkcyjnych (macierzystej substancji chemicznej/metabolitów). Podstawowe parametry toksykokinetyczne określone na podstawie tych badań dostarczą również informacji na temat potencjału akumulacji badanej substancji chemicznej w tkankach lub narządach oraz potencjału indukcji biotransformacji w wyniku narażenia na badaną substancję chemiczną.
2. Dane toksykokinetyczne mogą pomóc w ocenie adekwatności i znaczenia danych dotyczących toksyczności dla zwierząt na potrzeby ekstrapolacji na zagrożenie dla ludzi lub oceny ryzyka. Dodatkowo badania toksykokinetyczne mogą dostarczyć przydatnych informacji dla celów określenia poziomów dawkowania w badaniach toksyczności (kinetyka liniowa w porównaniu z kinetyką nieliniową), skutków drogi podania, biodostępności oraz zagadnień związanych z projektem badania. Określone typy danych toksykokinetycznych można wykorzystać do opracowania fizjologicznego modelu toksykokinetycznego (PBTK).
3. Istnieją ważne zastosowania dla danych dotyczących metabolitów/toksykokinetyki, takie jak wskazywanie możliwej toksyczności i charakteru działania oraz ich związku z poziomem dawkowania i drogą narażenia. Ponadto dane dotyczące metabolizmu mogą dostarczyć informacji przydatnych do oceny toksykologicznego znaczenia narażenia na egzogenne wytwarzane metabolity badanej substancji chemicznej.
4. Wystarczające dane toksykokinetyczne posłużą jako poparcie dalszej dopuszczalności i zastosowania ilościowych zależności struktura-aktywność, podejścia przekrojowego lub podejścia polegającego na grupowaniu w ramach oceny bezpieczeństwa chemikaliów. Dane kinetyczne można również wykorzystać do oceny znaczenia toksykologicznego innych badań (np. *in vivo/in vitro*).
5. Niniejsza metoda badawcza ma zastosowanie do podawania badanej substancji chemicznej drogą pokarmową, chyba że wymienia się inną drogę podawania (zob. zwłaszcza pkt 74–78).

WSTĘPNE ROZWAŻANIA

6. W systemach regulacji istnieją różne wymogi i potrzeby związane z pomiarem punktów końcowych i parametrów związanych z toksykokinetyką dla różnych klas substancji chemicznych (np. pestycydów, produktów biobójczych, chemikaliów przemysłowych). W przeciwieństwie do większości metod badawczych w niniejszej metodzie opisano badanie toksykokinetyczne, które obejmuje wiele pomiarów i punktów końcowych. W przyszłości może dojść do opracowania kilku nowych metod badawczych lub wytycznych, aby opisać każdy punkt końcowy odrębnie i w sposób bardziej szczegółowy. W przypadku niniejszej metody badawczej to, które badania lub oceny są przeprowadzane, jest określone zgodnie z wymogami lub potrzebami każdego systemu regulacji.
7. Istnieje wiele badań, które można przeprowadzić, aby ocenić zachowanie toksykokinetyczne badanej substancji chemicznej dla celów regulacyjnych. Niemniej jednak w zależności od określonych potrzeb regulacyjnych lub sytuacji nie wszystkie z tych możliwych badań mogą być konieczne dla oceny badanej substancji chemicznej. Projekt badań toksykokinetycznych wymaga elastyczności i uwzględnienia cech badanej substancji chemicznej będących przedmiotem zainteresowania. W niektórych przypadkach konieczne może być tylko rozpatrzenie określonego zestawu pytań, aby uwzględnić zagrożenie i ryzyko związane z badaną substancją chemiczną. W niektórych sytuacjach dane toksykokinetyczne można zgromadzić w ramach oceny w innych badaniach toksykologicznych. W innych przypadkach konieczne mogą być dodatkowe lub bardziej rozległe badania toksykokinetyczne, zależnie od potrzeb regulacyjnych lub jeżeli w trakcie oceny badanej substancji chemicznej pojawiają się nowe pytania.
8. Przed przeprowadzeniem badania laboratorium badawcze powinno wziąć pod uwagę wszystkie dostępne informacje na temat badanej substancji chemicznej oraz jej istotnych metabolitów i analogów w celu poprawienia jakości badania oraz uniknięcia niepotrzebnego wykorzystania zwierząt. Może to obejmować dane pochodzące z innych właściwych metod badawczych (badań *in vivo*, *in vitro* lub ocen *in silico*). Właściwości fizykochemiczne, takie jak: współczynnik podziału oktanol/woda (wyrażony jako $\log P_{OW}$), pKa, rozpuszczalność w

wodzie, prężność pary, masa cząsteczkowa substancji chemicznej, mogą być przydatne przy planowaniu badania i interpretacji wyników. Można je ustalić za pomocą odpowiednich metod opisanych w stosownych metodach badawczych.

OGRANICZENIA

9. Niniejsza metoda badawcza nie została opracowana do zastosowania w szczególnych okolicznościach, takich jak u zwierząt ciężarnych lub w okresie laktacji oraz u potomstwa, ani do oceny potencjalnych pozostałości u zwierząt narażonych na działanie substancji, od których lub z których pozyskuje się żywność. Dane uzyskane z badania B.36 mogą jednak zapewnić podstawowe informacje na potrzeby zaprojektowania konkretnych badań do takich celów. Niniejsza metoda badawcza nie jest przeznaczona do badania nanomateriałów. Sprawozdanie ze wstępnego przeglądu wytycznych OECD dotyczących badań w zakresie ich zastosowania do nanomateriałów wskazuje na to, że TG 417 (równoważna niniejszej metodzie badawczej B.36) może nie mieć zastosowania do nanomateriałów (1).

DEFINICJE

10. Definicje stosowane dla celów niniejszej metody badawczej przedstawiono w dodatku.

TROSKA O DOBROSTAN ZWIERZĄT

11. Wytyczne dotyczące humanitarnego traktowania zwierząt są dostępne w wytycznej OECD (GD) nr 19 (2). Zaleca się, aby we wszystkich badaniach *in vivo* i *in vitro* opisanych w niniejszej metodzie badawczej korzystać z wytycznej OECD GD nr 19.

OPIS METOD

Badania pilotażowe

12. Zaleca i poleca się korzystanie z badań pilotażowych na potrzeby wyboru parametrów doświadczalnych dla badań toksykokinetycznych (np. metabolizmu, bilansu masy, procedur analitycznych, zakresu dawkowania, wydychania CO₂ itd.). Opis niektórych z tych parametrów może nie wymagać użycia substancji chemicznych znakowanych izotopowo.

Wybór zwierząt

Gatunek

13. Gatunek zwierzęcia (i szczerp) wykorzystywany w badaniu toksykokinetycznym powinien być taki sam jak gatunek wykorzystany w innych badaniach toksykologicznych przeprowadzonych nad daną badaną substancją chemiczną. Zazwyczaj wykorzystywanym gatunkiem powinien być szczur, gdyż jest to gatunek szeroko wykorzystywany do badań toksykologicznych. Wykorzystanie innych lub dodatkowych gatunków może być uzasadnione, jeżeli kluczowe badania toksykologiczne wskazują na oznaki znacznej toksyczności u tych gatunków lub jeżeli wykazano, że ich toksyczność/toksykokinetyka ma większe znaczenie dla ludzi. Należy podać uzasadnienie wyboru gatunku i szczerpu zwierząt.
14. O ile nie wspomniano inaczej, w niniejszej metodzie badawczej szczura określa się gatunkiem badanym. W celu wykorzystania innych badanych gatunków konieczna może być modyfikacja pewnych aspektów tej metody.

Wiek i szczerp

15. Zaleca się wykorzystanie zdrowych, młodych, dorosłych zwierząt (zazwyczaj w wieku 6–12 tygodni w chwili dawkowania; zob. też pkt 13 i 14). W przypadku wykorzystywania zwierząt innych niż młode dorosłe osobniki należy podać uzasadnienie. Na początku badania wszystkie zwierzęta powinny być w podobnym wieku. Odchylenie masy poszczególnych zwierząt nie powinno przekraczać $\pm 20\%$ średniej masy badanej grupy. Najlepiej byłoby, gdyby wykorzystywany szczerp był taki sam jak szczerp wykorzystany do otrzymania bazy danych toksykologicznych dotyczących badanej substancji chemicznej.

Liczba i płeć zwierząt

16. Dla każdej zbadanej dawki należy wykorzystać przynajmniej cztery zwierzęta jednej płci. Płeć wykorzystanych zwierząt należy uzasadnić. Należy rozważyć wykorzystanie obu płci (czterech samców i czterech samic), jeżeli istnieją dowody potwierdzające znaczne różnice w toksyczności związane z płcią.

Warunki przetrzymywania i karmienia

17. W okresie badania zwierzęta na ogół należy przetrzymywać oddzielnie. Przetrzymywanie w grupach może być uzasadnione w szczególnych okolicznościach. Oświetlenie powinno być sztuczne, w cyklu 12 h światła, 12 h ciemności. Temperatura w pomieszczeniach dla zwierząt doświadczalnych powinna wynosić 22 °C (± 3 °C), a względna wilgotność 30–70 %. Do karmienia można stosować konwencjonalne pasze laboratoryjne z nieograniczonym dostępem do wody pitnej.

Badana substancja chemiczna

18. Znakowana izotopowo badana substancja chemiczna z wykorzystaniem węgla ^{14}C powinna być stosowana we wszystkich aspektach badania związanych z bilansem masy i identyfikacją metabolitów; jeżeli jednak można wykazać, że:

- bilans masy i identyfikację metabolitów można odpowiednio ocenić za pomocą badanej substancji chemicznej nieznakowanej izotopowo,
- swoistość i czułość analityczna metody stosowanej wraz z niepromieniotwórczą badaną substancją chemiczną są równe tym, które można uzyskać przy użyciu badanej substancji chemicznej znakowanej izotopowo, lub wyższe,

wówczas nie trzeba stosować znakowanej izotopowo badanej substancji chemicznej. Ponadto można stosować inne promieniotwórcze stabilne izotopy, w szczególności jeśli dany pierwiastek w całości lub częściowo odpowiada za toksyczność badanej substancji chemicznej. Jeżeli to możliwe, znakowanie izotopowe powinno znajdować się w centralnej części cząsteczki, która jest metabolicznie stabilna (nie podlega wymianie, nie jest usuwana metabolicznie jako CO_2 i nie staje się częścią puli fragmentów jednowęglowych organizmu). Znakovanie wielu miejsc lub określonych regionów cząsteczki może być niezbędne do śledzenia przebiegu metabolizmu badanej substancji chemicznej.

19. Znakowane i nieznakowane izotopowo badane substancje chemiczne należy analizować za pomocą odpowiednich metod, aby określić czystość i tożsamość. Czystość radiochemiczna badanej promieniotwórczej substancji chemicznej powinna być możliwie najwyższa z możliwych dla danej substancji (w idealnych warunkach powinna być wyższa niż 95 %). Należy dołożyć rozsądnych starań, aby zidentyfikować zanieczyszczenia obecne na poziomie 2 % lub wyższym. Należy podać czystość wraz z tożsamością i odsetkiem wszelkich zidentyfikowanych zanieczyszczeń. W poszczególnych programach regulacji przewidziane może być zapewnienie dodatkowych wytycznych pomocnych w definiowaniu i specyfikacji badanych substancji chemicznych złożonych z mieszanin, a także metod ustalania czystości.

Wybór dawki*Badanie pilotażowe*

20. Zazwyczaj do badania pilotażowego wystarczy pojedyncza dawka doustna. Dawka ta powinna być nietoksyczna, lecz wystarczająco wysoka, aby umożliwić identyfikację metabolitów w wydalinach (i w stosownych przypadkach w osoczu), jak również spełniać określony cel badania pilotażowego, o którym mowa w pkt 12 niniejszej metody badawczej.

Badania główne

21. W przypadku badań głównych preferowane są co najmniej dwie dawki, ponieważ informacje zebrane z przynajmniej dwóch grup otrzymujących dawki mogą pomóc w określeniu dawek w innych badaniach toksyczności oraz pomóc w ocenie dawka-odpowiedź w ramach już dostępnych badań toksyczności.

22. W przypadku podawania dwóch dawek obie dawki powinny być wystarczająco wysokie, aby umożliwić identyfikację metabolitów w wydalinach (i w stosownych przypadkach w osoczu). Przy wyborze dawki należy uwzględnić informacje pochodzące z dostępnych danych dotyczących toksyczności. Jeżeli informacje takie nie są dostępne (np. pochodzące z badań toksyczności ostrej doustnej, w których odnotowano kliniczne oznaki toksyczności, lub z badań toksyczności wywołanej powtarzanym dawkowaniem), można rozważyć taką wartość wyższej dawki, która jest niższa od szacowanej wartości LD_{50} (droga doustna i droga dermalna) lub LC_{50} (droga inhalacyjna) lub niższa od niższej wartości szacowanego przedziału toksyczności ostrej. Niższa dawka powinna stanowić pewien ułamek wyższej dawki.

23. W przypadku badania wyłącznie jednego poziomu dawkowania najlepiej byłoby, gdyby dawka była wystarczająco wysoka, aby umożliwić identyfikację metabolitów w wydalinach (i w stosownych przypadkach w osoczu), jednocześnie nie wywołując widocznej toksyczności. Jeżeli drugiego poziomu dawkowania nie uwzględniono, należy to uzasadnić.

24. Jeżeli istnieje potrzeba ustalenia skutków dawki dla procesów kinetycznych, dwie dawki mogą być niewystarczające i przynajmniej jedna dawka powinna być wystarczająco duża, aby nasycić te procesy. Jeżeli pole pod krzywą (AUC) stężenia w osoczu w czasie między dwiema dawkami wykorzystanymi w badaniu głównym nie jest liniowe, jest to silna przesłanka, że gdzieś pomiędzy tymi dwoma poziomami dawkowania występuje nasycenie jednego procesu kinetycznego lub większej ich liczby.

25. W przypadku badanych substancji chemicznych o niskiej toksyczności należy zastosować maksymalną dawkę 1 000 mg/kg masy ciała (droga doustna i droga dermalna; podawanie drogą inhalacyjną - zob. rozdział B.2 niniejszego załącznika; zazwyczaj dawka ta nie przekracza 2 mg/l). Okoliczności specyficzne dla danej substancji chemicznej mogą wymagać zastosowania większej dawki w zależności od potrzeb regulacyjnych. Wybór dawki zawsze należy uzasadnić.

26. Toksykokinetyka pojedynczej dawki i dane dotyczące dystrybucji w tkankach mogą być wystarczające do określenia potencjału akumulacji lub trwałości. W pewnych okolicznościach potrzebne jednak może być podanie powtarzane (i) aby w bardziej kompletny sposób zbadać potencjał akumulacji lub trwałości bądź zmiany w toksykokinetyce (tj. na przykład w indukcji i inhibicji enzymatycznej); lub (ii) zgodnie z wymogami mającego zastosowanie systemu regulacji. W badaniach z zastosowaniem powtarzanego dawkowania w pewnych okolicznościach również konieczne może być powtarzane podanie dużej dawki, chociaż zazwyczaj wystarcza powtarzane podanie małej dawki (zob. także pkt 57).

Podawanie badanej substancji chemicznej

27. Badaną substancję chemiczną należy rozpuścić lub sporządzić jednorodną zawiesinę w tym samym nośniku, który wykorzystano w innych badaniach toksyczności doustnej dotyczących podawania danej badanej substancji chemicznej za pomocą sondy, jeżeli takie informacje na temat nośnika są dostępne. Należy przedstawić uzasadnienie wyboru nośnika. Wybór nośnika i objętość dawki należy uwzględnić w projekcie badania. Zwyczajową metodą podawania jest podawanie przez sondę, jednak podawanie substancji w kapsułkach żelatynowych lub zmieszanej z pokarmem może być w określonych sytuacji korzystniejsze (w obu przypadkach należy przedstawić uzasadnienie). Należy zapewnić weryfikację rzeczywistej dawki podanej każdemu zwierzęciu.
28. Maksymalna objętość cieczy, jaką można podać jednorazowo za pomocą sondy, zależy od wielkości badanego zwierzęcia, rodzaju nośnika oraz tego, czy przed podaniem badanej substancji chemicznej wstrzymuje się podawanie pokarmu. Należy przedstawić uzasadnienie podawania lub ograniczenia podawania pokarmu przed podaniem dawki. Zwykle objętość powinna być utrzymywana na możliwie niskim poziomie, jaki jest praktyczny dla nośników wodnych lub bezwodnych. Objętość dawki zazwyczaj nie powinna przekraczać 10 ml/kg masy ciała w przypadku gryzoni. Objętość nośników stosowanych w przypadku bardziej lipofilnych badanych substancji chemicznych może rozpoczynać się od 4 ml/kg masy ciała. W odniesieniu do powtarzanego dawkowania, gdzie codzienne wstrzymywanie podawania pokarmu byłoby niewskazane, należy rozważyć mniejszą objętość dawki (np. 2-4 ml/kg masy ciała). W miarę możliwości można rozważyć zastosowanie objętości dawki zgodnej z dawką badanej substancji chemicznej podawaną drogą pokarmową przez sondę w ramach innych badań.
29. Podawanie dożylnie badanej substancji chemicznej i pomiar tej substancji we krwi lub w wydalinach można wykorzystać do ustalenia biodostępności lub względnego wchłaniania po podaniu doustnym. W przypadku badania po podaniu dożylnym podaje się pojedynczą dawkę (zwykle odpowiadającą mniejszej dawce podawanej drogą doustną, lecz jej nieprzekraczającą – zob. wybór dawki) badanej substancji chemicznej z zastosowaniem odpowiedniego nośnika. Materiał ten należy podawać w odpowiedniej objętości (np. 1 ml/kg masy ciała) w wybranym miejscu podania co najmniej czterem zwierzętom odpowiedniej płci (jeśli jest to uzasadnione, można wykorzystać obie płci, zob. pkt 16). W przypadku dożylnego podania badanej substancji chemicznej konieczne jest przygotowanie w pełni rozpuszczonej dawki lub zawiesiny. Nośnik dla podania dożylnego nie powinien zakłócać integralności ani przepływu krwi. Jeśli badana substancja chemiczna podawana jest we wlewie, szybkość wlewu powinna być podana i ujednolicona pomiędzy zwierzętami, pod warunkiem że stosowana jest pompa infuzyjna. Należy zastosować znieczulenie w przypadku wprowadzania kaniuli do żyły szyjnej (w celu podania badanej substancji chemicznej lub pobrania krwi) lub jeżeli do podania wykorzystuje się tętnicę udową. Należy rozważyć rodzaj znieczulenia, ponieważ może mieć on wpływ na toksykokinetykę. Przed podaniem badanej substancji chemicznej wraz z nośnikiem zwierzętom należy umożliwić odpowiednią regenerację.
30. W przypadku konkretnych badanych substancji chemicznych zastosowanie mogą mieć inne drogi podania, takie jak droga dermalna i inhalacyjna (zob. pkt 74-78), biorąc pod uwagę cechy fizykochemiczne tych substancji i spodziewane zastosowanie przez człowieka lub narażenie ludzi.

Pomiary

Bilans masy

31. Bilans masy określa się poprzez zsumowanie odsetka podanej (promieniotwórczej) dawki wydalonej w moczu, kale i wydychanym powietrzu oraz odsetka obecnego w tkankach, reszcie ciała i materiale wyphukanym z klatki (zob. pkt 46). Na ogół całkowity odzysk podanej badanej substancji chemicznej (promieniotwórczej) rzędu > 90 % uważa się za wystarczający.

Wchłanianie

32. Wstępne oszacowanie absorpcji można uzyskać poprzez wyłączenie odsetka dawki w przewodzie pokarmowym lub w kale z pomiaru bilansu masy. Obliczanie odsetka wchłaniania – zob. pkt 33. Badanie wydaliny – zob. pkt 44-49. Jeżeli dokładnego stopnia wchłaniania po podaniu dawki drogą doustną nie można określić na podstawie badań bilansu masy (np. jeżeli więcej niż 20 % podanej dawki występuje w kale), konieczne mogą być dalsze badania. Badania te mogą obejmować albo 1) podanie badanej substancji chemicznej drogą doustną i pomiar tej substancji w żółci; albo 2) podanie badanej substancji chemicznej drogą doustną i dożylną oraz pomiar badanej substancji chemicznej netto w moczu, wydychanym powietrzu i ciele dla każdej z obu tych dróg podania. W obu projektach badania pomiar promieniotwórczości wykonuje się jako zastępczą metodę swoistej analizy chemicznej badanej substancji chemicznej i metabolitów.
33. W przypadku przeprowadzania badania wydalania z żółcią zazwyczaj stosuje się doustną drogę podawania. W badaniu tym wprowadza się kaniulę do przewodów żółciowych co najmniej czterech zwierząt odpowiedniej płci (lub w uzasadnionych przypadkach obu płci) i podaje pojedynczą dawkę badanej substancji chemicznej. Po podaniu tej substancji wydalanie promieniotwórczości/badanej substancji chemicznej w żółci należy monitorować tak długo, jak będzie to konieczne do oszacowania odsetka podanej dawki, która jest wydalana tą drogą, co można wykorzystać do bezpośredniego obliczenia stopnia wchłaniania po podaniu doustnym w następujący sposób:

Wartość procentowa wchłaniania = $(\text{ilość w żółci} + \text{mocz} + \text{wydychanym powietrzu} + \text{ciele bez zawartości przewodu pokarmowego}) / \text{podana ilość} \times 100$

34. W przypadku niektórych klas badanych substancji chemicznych może wystąpić bezpośrednie wydzielanie wchłoniętej dawki przez błony jelitowe. W takiej sytuacji pomiaru % dawki w kale po doustnym podaniu dawki kaniulą wprowadzoną w drogi żółciowe szczura nie uważa się za wartość reprezentatywną dla niewchłoniętej dawki. Zaleca się, aby w przypadkach, w których sądzi się, że zachodzi wydzielanie jelitowe, % wchłoniętej dawki opierał się na wchłanianiu obliczonym poprzez porównanie wydalania po podaniu dawki drogą doustną i drogą dożylną (szczur nienaruszony lub z kaniulą wprowadzoną w drogi żółciowe) (zob. pkt 35). Zaleca się również, aby w przypadku, gdy oznaczanie ilościowe wydzielania jelitowego uważa się za konieczne, mierzone były wydalinę u szczura z kaniulą wprowadzoną w drogi żółciowe po podaniu dawki drogą dożylną.

Biodostępność

35. Biodostępność można określić na podstawie kinetyki osocza/krwi w odniesieniu do grup, które daną substancję otrzymują drogą doustną i dożylną, jak opisano w pkt 50-52, poprzez specyficzną analizę chemiczną badanej substancji lub istotnych metabolitów, a tym samym nie wymaga to stosowania badanej substancji chemicznej znakowanej izotopowo. Biodostępność (F) badanej substancji chemicznej lub istotnych metabolitów można zatem obliczyć w następujący sposób:

$$F = (AUC_{\text{exp}}/AUC_{\text{IV}}) \times (\text{dawka}_{\text{IV}}/\text{dawka}_{\text{exp}})$$

gdzie AUC jest polem pod krzywą stężenia w osoczu w czasie, a exp jest doświadczalną drogą podania (doustną, dermalną lub inhalacyjną).

36. Dla celów zastosowania w ocenie ryzyka skutków ogólnoustrojowych biodostępność składnika toksycznego jest na ogół preferowana nad odsetek wchłaniania, gdy porównuje się stężenia ogólnoustrojowe pochodzące z badań na zwierzętach z analogicznymi danymi z biomonitoringu uzyskanymi z badań narażenia pracowników. Sytuacja może stać się bardziej złożona, jeżeli dawki znajdują się w zakresie nieliniowym, dlatego ważne jest, aby w przesiewowych badaniach toksykokinetycznych dawki określać w zakresie liniowym.

Dystrybucja w tkankach

37. Wiedza o dystrybucji badanej substancji chemicznej lub jej metabolitów w tkankach jest ważna dla identyfikacji tkanek docelowych, a także dla zrozumienia podstawowych mechanizmów toksyczności oraz dla uzyskania informacji dotyczących potencjału akumulacji i trwałości badanej substancji chemicznej i metabolitów. Odsetek całkowitej (promieniotwórczej) dawki w tkankach i w reszcie ciała należy zbadać przynajmniej na zakończenie doświadczenia związanego z wydalaniem (tzn. zazwyczaj do 7 dni po podaniu dawki lub wcześniej, w zależności od zachowania badanej substancji chemicznej). W przypadku niewykrycia badanej substancji chemicznej w tkankach w chwili zakończenia badania (np. ponieważ z powodu krótkiego okresu półtrwania badana substancja mogła zostać usunięta przed zakończeniem badania) należy zachować ostrożność, aby zapobiec błędnej interpretacji danych. W tego typu sytuacji dystrybucję w tkankach należy zbadać w chwili, gdy stężenie badanej substancji chemicznej (lub metabolitu) osiąga odpowiednio szczytowe stężenie w krwi/osoczu (T_{max}) lub szczytowy poziom wydzielania z moczem (zob. pkt 38). Ponadto pobieranie tkanek w dodatkowych punktach czasowych może być konieczne dla określenia dystrybucji badanej substancji chemicznej lub jej metabolitów w tkankach, ocenienia (w stosownych przypadkach) zależności od czasu, pomocniczo dla określenia bilansu masy lub wymagane przez właściwy organ. Do tkanek, które należy pobrać, należą: wątroba, tłuszcz, przewód pokarmowy, nerka, śledziona, krew pełna, reszta ciała, tkanki organu docelowego i wszelkie inne tkanki (np. tarczyca, erytrocyty, organy rozrodcze, skóra, oko (szczególnie u zwierząt zabarwionych)) mające potencjalne znaczenie przy toksykologicznej ocenie badanej substancji chemicznej. Należy rozważyć analizę dodatkowych tkanek w tych samych punktach czasowych, aby zmaksymalizować wykorzystanie zwierząt, i w przypadku gdy toksyczność dla organu docelowego obserwuje się w badaniach toksyczności podprzewlekłej lub przewlekłej. Należy również podać stężenie rezydualne (promieniotwórczość) i współczynniki podziału tkanki/osocze (krew).
38. Ocena dystrybucji w tkankach w dodatkowych punktach czasowych, takich jak moment szczytowego stężenia w osoczu/krwi (np. T_{max}) lub szczytowego poziomu wydzielania z moczem, uzyskana z odpowiednich badań kinetyki osocza/krwi lub wydaliny, również może być potrzebna lub wymagana przez właściwy organ. Informacje te mogą być przydatne dla zrozumienia toksyczności oraz potencjału akumulacji i trwałości badanej substancji chemicznej i metabolitów. Należy podać uzasadnienie wyboru próbek; próbki do analizy na ogół powinny być takie same, jak określone powyżej (zob. pkt 37).
39. Oznaczanie ilościowe promieniotwórczości na potrzeby badań dystrybucji w tkankach można przeprowadzić poprzez wycięcie organów, ich homogenizację, spalenie lub rozpuszczenie, a następnie poddanie uwieczonych pozostałości analizie za pomocą scyntylacyjnego licznika cieczowego. Pewne techniki, obecnie znajdujące się na różnych etapach rozwoju, np. ilościowa autoradiografia całego ciała i mikroskopowa autoradiografia receptorów, mogą okazać się przydatne przy określaniu dystrybucji badanej substancji chemicznej w organach lub tkankach (3) (4).
40. W przypadku dróg narażenia innych niż droga doustna należy pobrać i przeanalizować określone tkanki, takie jak płuca – w badaniach inhalacyjnych lub skóra – w badaniach z zastosowaniem dermalnej drogi podania. Zob. pkt 74–78.

Metabolizm

41. Wydaliny (i w stosownych przypadkach osocze) należy zbierać w celu identyfikacji i pomiaru ilościowego niezmienionej badanej substancji chemicznej i metabolitów zgodnie z opisem w pkt 44–49. Dopuszczalne jest łączenie wydaliny, aby ułatwić identyfikację metabolitu w danej grupie otrzymującej dawkę. Zalecane jest profilowanie metabolitów pochodzących z każdego okresu. Jeżeli uniemożliwia to brak próbki lub promieniotwórczość, dopuszczalne jest jednak łączenie moczu i kału z kilku punktów czasowych, lecz niedopuszczalne jest łączenie wydaliny z grup różnej płci lub otrzymujących odmienne dawki. W celu zbadania moczu, kału, pozostałości promieniotwórczości u zwierząt poddanych działaniu substancji i w stosownych przypadkach żółci należy wykorzystać odpowiednie metody ilościowe i jakościowe.
42. Należy dołożyć rozsądnych starań, aby zidentyfikować wszystkie metabolity obecne na poziomie 5 % podanej dawki lub wyższym oraz określić układ metaboliczny badanej substancji chemicznej. Badaną substancję chemiczną, którą scharakteryzowano w wydalinach jako stanowiącą co najmniej 5 % podanej dawki, należy zidentyfikować. Identyfikacja odnosi się do dokładnego strukturalnego określenia składników. Zazwyczaj identyfikacji towarzyszy albo chromatografia równoległa metabolitu o znanych standardach z zastosowaniem dwóch odmiennych układów, albo techniki umożliwiające pozytywną identyfikację strukturalną, takie jak spektrometria masowa, spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) itd. W przypadku chromatografii równoległej technik chromatograficznych wykorzystujących tę samą fazę stacjonarną przy dwóch różnych układach rozpuszczalników nie uważa się za odpowiednią weryfikację tożsamości metabolitu za pomocą dwóch metod, ponieważ metody te nie są niezależne. Identyfikację poprzez chromatografię równoległą należy przeprowadzić z zastosowaniem dwóch odmiennych, niezależnych analitycznie układów, takich jak chromatografia cienkowarstwowa w normalnym i odwróconym układzie faz (TLC) i wysokosprawną chromatografią cieczową (HPLC). O ile rozdzielanie chromatograficzne charakteryzuje się wystarczającą jakością, dodatkowe potwierdzenie za pomocą metod spektroskopowych nie jest potrzebne. Ewentualnie jednoznaczna identyfikację można również uzyskać, korzystając z metod dostarczających informacje strukturalne, takich jak: chromatografia cieczowa/spektrometria masowa (LC-MS) lub chromatografia cieczowa/tandemowa spektrometria masowa (LC-MS/MS), chromatografia gazowa/spektrometria masowa (GC-MS) oraz spektrometria NMR.
43. Jeżeli identyfikacja metabolitów obecnych na poziomie 5 % podanej dawki lub wyższym jest niemożliwa, w sprawozdaniu końcowym należy przedstawić uzasadnienie/wyjaśnienie. Aby uzyskać lepsze zrozumienie szlaku metabolicznego na potrzeby oceny zagrożenia lub ryzyka związanego z badaną substancją chemiczną, właściwa może być identyfikacja metabolitów stanowiących mniej niż 5 % podanej dawki. W miarę możliwości należy podać potwierdzenie strukturalne. Może ono obejmować profilowanie w osoczu, krwi lub innych tkankach.

Wydalenie

44. Szybkość i stopień wydalania podanej dawki należy określić poprzez pomiar odsetka odzyskanej (promieniotwórczej) dawki z moczu, kału i wydychanego powietrza. Dane te pomogą również w określeniu bilansu masy. Ilości badanej substancji chemicznej (promieniotwórczości) wydalanej w moczu, kale i wydychanym powietrzu należy określać w odpowiednich odstępach czasowych (zob. pkt 47–49). Doświadczenia z powtarzaniem dawkowaniem należy odpowiednio zaprojektować, aby umożliwić zbieranie danych dotyczących wydaliny w celu zrealizowania celów opisanych w pkt 26. Umożliwi to porównanie z doświadczeniami z pojedynczą dawką.
45. Jeżeli badanie pilotażowe wykazało, że w wydychanym powietrzu nie jest wydalana istotna ilość badanej substancji chemicznej (promieniotwórczości) (zgodnie z pkt 49), wówczas w ostatecznym badaniu wydychane powietrze nie musi być gromadzone.
46. Każde zwierze należy umieścić w oddzielnej jednostce metabolicznej w celu zebrania wydaliny (mocz, kał i wydychane powietrze). Na koniec każdego okresu zbierania (zob. pkt 47–49) jednostkę metaboliczną należy spłukać odpowiednim rozpuszczalnikiem (tzw. »materiał wypłukany z klatki«), aby zapewnić maksimum odzysku badanej substancji chemicznej (promieniotwórczości). Zbieranie wydaliny należy zakończyć 7 dnia lub po odzyskaniu co najmniej 90 % podanej dawki, w zależności od tego, co nastąpi wcześniej.
47. Całkowitą ilość badanej substancji chemicznej (promieniotwórczości) w moczu należy określić dla przynajmniej dwóch punktów czasowych w pierwszym dniu zbierania, z czego jeden punkt powinien mieć miejsce 24 godziny po podaniu dawki, a następnie każdego dnia aż do zakończenia badania. Zachęca się wybranie więcej niż dwóch punktów zbierania moczu w pierwszym dniu (np. po 6, 12 i 24 godzinach). Należy przeanalizować wyniki badań pilotażowych, aby uzyskać informacje dotyczące innych lub dodatkowych punktów czasowych w odniesieniu do zbierania moczu. Należy podać uzasadnienie harmonogramu zbierania.
48. Całkowitą ilość badanej substancji chemicznej (promieniotwórczości) w kale należy określać codziennie, począwszy od 24 godzin od podania dawki aż do zakończenia badania, chyba że badania pilotażowe wskazują na inne lub dodatkowe punkty czasowe w odniesieniu do zbierania kału. Należy podać uzasadnienie innego harmonogramu zbierania kału.
49. Gromadzenie wydychanego CO₂ i innych lotnych materiałów można przerwać w danym doświadczeniu badawczym, jeżeli w wydychanym powietrzu wykryto mniej niż 1 % podanej dawki w okresie zbierania powietrza wynoszącym 24 godziny.

Badania przebiegu w czasie*Kinetyka osocza/krwi*

50. Celem tych badań jest uzyskanie szacunków dotyczących podstawowych parametrów toksykokinetycznych [np. C_{max} , T_{max} , okres półtrwania ($t_{1/2}$), pole pod krzywą] w odniesieniu do badanej substancji chemicznej. Badania te można przeprowadzać w ramach jednej dawki lub – co bardziej prawdopodobne – przy co najmniej dwóch dawkach. Dawkę należy określić zgodnie z charakterem doświadczenia lub zagadnieniem, którego ono dotyczy. Dane dotyczące kinetyki mogą być potrzebne w odniesieniu do takich kwestii, jak biodostępność badanej substancji chemicznej, lub dla celów wyjaśnienia skutków dawki dla klirensu (np. czy klirens jest nasycony w sposób zależny od dawki).
51. Na potrzeby tych badań w każdej grupie otrzymującej dawkę powinny znaleźć się co najmniej cztery zwierzęta jednej płci. Płeć wykorzystanych zwierząt należy uzasadnić. Należy rozważyć wykorzystanie obu płci (czterech samców i czterech samic), jeżeli istnieją dowody potwierdzające znaczne różnice w toksyczności związane z płcią.
52. Po podaniu badanej substancji chemicznej (znakowanej izotopowo) należy pobrać próbki krwi od każdego zwierzęcia w odpowiednich punktach czasowych za pomocą odpowiedniej metody pobierania próbek. Rozmiar i liczba próbek krwi, które można uzyskać od pojedynczego zwierzęcia, mogą być ograniczone potencjalnymi skutkami powtarzanego pobierania próbek na zdrowie/fizjologię zwierzęcia lub czułością metody analitycznej. Próbkę należy poddać analizie w odniesieniu do każdego zwierzęcia. W pewnych okolicznościach (np. przy charakterystyce metabolitu) konieczne może się okazać łączenie próbek pochodzących od więcej niż jednego zwierzęcia. Próbkę zbiorczą należy wyraźnie zidentyfikować i podać wyjaśnienie łączenia próbek. W przypadku stosowania badanej substancji chemicznej znakowanej izotopowo właściwa może być analiza obecnej promieniotwórczości ogółem. W takiej sytuacji promieniotwórczość ogółem należy przeanalizować w krwi pełnej i osoczu lub w osoczu i krwinkach czerwonych, aby umożliwić obliczenie współczynnika podziału krew/osocze. W innych okolicznościach konieczne może być bardziej szczegółowe badanie wymagające identyfikacji związku macierzystego lub metabolitów bądź oceny wiązań białkowych.

Kinetyka innych tkanek

53. Celem tych badań jest uzyskanie informacji na temat przebiegu w czasie, aby odpowiedzieć na pytania związane z takimi kwestiami, jak: charakter działania toksycznego, bioakumulacja lub biotrwałość, poprzez określenie poziomów badanej substancji chemicznej w różnych tkankach. Wybór tkanek i liczba ocenianych punktów czasowych będą zależne od kwestii, którą należy zbadać, i od bazy danych toksykologicznych dotyczących badanej substancji chemicznej. W projekcie tych dodatkowych badań kinetyki tkanek należy uwzględnić informacje zgromadzone zgodnie z opisem zawartym w pkt 37–40. Badania te mogą obejmować dawkowanie jednorazowe lub powtarzane. Należy przedstawić szczegółowe uzasadnienie zastosowanego podejścia.
54. Powody przeprowadzania badań kinetycznych innych tkanek mogą obejmować:
- dowody na wydłużony okres półtrwania w krwi, co wskazuje na możliwość akumulacji badanej substancji chemicznej w różnych tkankach, lub
 - chęć sprawdzenia, czy w określonych tkankach osiągnięto poziom w stanie ustalonym (np. w badaniach z powtarzanym dawkowaniem, nawet jeżeli mogło dojść do widocznego osiągnięcia poziomu stężenia badanej substancji chemicznej we krwi w stanie ustalonym, może być potrzebne upewnienie się, że stan ustalony został osiągnięty również w tkankach docelowych).
55. W przypadku tego rodzaju badań przebiegu w czasie odpowiednią dawkę badanej substancji chemicznej należy podać drogą doustną co najmniej czterem zwierzętom na dawkę w każdym punkcie czasowym i monitorować w wybranych tkankach przebieg dystrybucji w czasie. Można wykorzystać tylko jedną płęć, chyba że zaobserwowano toksyczność zależną od płci. To, czy analiza obejmie promieniotwórczość ogółem, czy substancję macierzystą lub metabolity, będzie też zależało od kwestii, której badanie dotyczy. Ocenę dystrybucji w tkance należy przeprowadzić za pomocą odpowiednich technik.

Indukcja/inhibicja enzymatyczna

56. Badania dotyczące możliwych skutków indukcji/inhibicji enzymatycznej lub biotransformacji badanej substancji chemicznej mogą być konieczne w co najmniej jednym z następujących przypadków:
- 1) dostępne dowody wskazują na zależność pomiędzy biotransformacją badanej substancji chemicznej a zwiększoną toksycznością;
 - 2) dostępne dane dotyczące toksyczności wskazują na nieliniową zależność pomiędzy dawką a metabolizmem;
 - 3) wyniki badań dotyczących identyfikacji metabolitów wskazują na identyfikację potencjalnie toksycznego metabolitu, który mógł zostać wytworzony poprzez ścieżkę enzymatyczną wywołaną przez badaną substancję chemiczną;
 - 4) w odniesieniu do wyjaśnienia skutków, co do których zakłada się, że są związane ze zjawiskiem indukcji enzymatycznej;

- 5) jeżeli w profilu metabolicznym badanej substancji zaobserwowano zmiany istotne pod względem toksykologicznym w ramach doświadczeń *in vitro* lub *in vivo* prowadzonych na innych gatunkach lub w innych warunkach, konieczne może być scharakteryzowanie zaangażowanych enzymów (np. enzymy fazy I, takie jak izoenzymy układu monooksygenaz zależnych od cytochromu P450, enzymy fazy II, takie jak izoenzymy siarkotransferazy lub transferaza urydynodifosfoglukuronowa bądź wszelkie inne istotne enzymy). Informacje te można wykorzystać do oceny zasadności wykorzystania danego gatunku w ekstrapolacji gatunkowej.
57. Należy zastosować odpowiednie protokoły badania służące do oceny zmian w toksykokinetyce związanych z badaną substancją chemiczną, poddane stosownej walidacji i uzasadnione. Przykładowy projekt badania obejmuje powtarzane podawanie badanej substancji chemicznej nieznakowanej izotopowo, następnie podanie w 14. dniu pojedynczej dawki znakowanej izotopowo lub powtarzane podawanie badanej substancji chemicznej znakowanej izotopowo i pobieranie próbek w 1., 7. i 14. dniu w celu określenia profili metabolitów. Powtarzane podawanie badanej substancji chemicznej znakowanej izotopowo może również dostarczyć informacji na temat bioakumulacji (zob. pkt 26).

METODY UZUPEŁNIAJĄCE

58. Uzupełniające rodzaje podejścia wykraczające poza doświadczenia *in vivo* opisane w niniejszej metodzie badawczej mogą dostarczyć przydatnych informacji na temat wchłaniania, dystrybucji, metabolizmu i eliminacji badanej substancji chemicznej u niektórych gatunków.

Wykorzystywanie informacji z badań *in vitro*

59. W badaniach *in vitro* z zastosowaniem odpowiednich układów badawczych można rozważyć kilka kwestii dotyczących metabolizmu badanej substancji chemicznej. Do badania możliwych metabolitów można wykorzystywać świeżo wyizolowane lub hodowane hepatocyty i frakcje subkomórkowe (np. mikrosomy i cytozol lub frakcję S9) wątroby. Metabolizm miejscowy w organie docelowym, np. w płucu, może mieć znaczenie dla oceny ryzyka. Dla tych celów użyteczne mogą być mikrosomalne frakcje tkanek docelowych. Badania z mikrosomami mogą być przydatne, jeżeli chodzi o uwzględnienie potencjalnych różnic płci i etapu życia oraz scharakteryzowanie parametrów enzymatycznych (K_m i V_{max}), które mogą pomóc w ocenie zależności metabolizmu od dawki w odniesieniu do poziomów narażenia. Ponadto mikrosomy mogą być przydatne do identyfikowania konkretnych enzymów mikrosomalnych biorących udział w metabolizmie badanej substancji chemicznej, które mogą być istotne w ekstrapolacji gatunkowej (zob. też pkt 56). Potencjał indukcji biotransformacji można również badać przy użyciu frakcji subkomórkowych wątroby (np. mikrosomów i cytozolu) zwierząt wcześniej poddanych działaniu danej badanej substancji chemicznej, *in vitro* poprzez badania indukcji w hepatocytach lub z wykorzystaniem określonych linii komórkowych oddających odpowiednie enzymy. W pewnych okolicznościach i w odpowiednich warunkach można wziąć pod uwagę użycie frakcji subkomórkowych pochodzących z tkanek ludzkich w celu określenia potencjalnych różnic między gatunkami pod względem biotransformacji. Te wyniki badań *in vitro* mogą również być przydatne do opracowania modeli PBTK (5).
60. Badania wchłaniania przez skórę *in vitro* mogą dostarczyć dodatkowych informacji na potrzeby scharakteryzowania wchłaniania (6).
61. Na potrzeby kwestii podobnych do tych, w których bada się mikrosomy wątroby, można wykorzystywać pierwotne hodowle komórkowe z komórek wątroby i płaty świeżej tkanki. W niektórych przypadkach można uzyskać odpowiedź na konkretne pytania przy użyciu linii komórkowych o określonej ekspresji odpowiedniego enzymu lub modyfikowanych linii komórkowych. W pewnych sytuacjach przydatne może być przeanalizowanie za pomocą badań *in vitro* zahamowania i indukowania określonych izoenzymów cytochromu P450 (np. CYP1A1, 2E1, 1A2 i in.) lub enzymów fazy II przez związek macierzysty. Uzyskane informacje mogą być użyteczne w odniesieniu do związków o podobnej strukturze.

Wykorzystywanie danych toksykokinetycznych z badań toksyczności jako informacji uzupełniających

62. Analiza próbek krwi, tkanek lub wydaliny uzyskanych podczas przeprowadzania wszelkich innych badań toksyczności może dostarczyć danych na temat biodostępności, zmian stężenia w osoczu w czasie (pole pod krzywą, C_{max}), potencjału bioakumulacji, klirensu oraz zmian metabolizmu i kinetyki zależnych od płci lub etapu życia.
63. Rozważania dotyczące projektu badania można wykorzystać, aby odpowiedzieć na pytania odnoszące się do: nasycenia szlaków wchłaniania, biotransformacji lub wydalania przy wyższych poziomach dawkowania; działania nowych szlaków metabolicznych przy większych dawkach oraz ograniczenia toksycznych metabolitów do wyższych dawek.
64. W innych rozważaniach związanych z oceną zagrożenia można uwzględnić takie kwestie, jak:
- związana z wiekiem wrażliwość wynikająca z różnic w statusie bariery krew-mózg, zdolności metabolicznej nerek lub zdolnościach detoksykacyjnych,
 - wrażliwość subpopulacji wynikająca z różnic w zdolności do biotransformacji lub innych różnic toksykokinetycznych,
 - stopień narażenia płodu poprzez transfer przezłożyskowy substancji chemicznych lub noworodka poprzez laktację.

Korzystanie z modelowania toksykokinetycznego

65. Modele toksykokinetyczne mogą być przydatne do różnych aspektów oceny zagrożenia i ryzyka, na przykład do przewidzenia narażenia ogólnoustrojowego i dawki w odniesieniu do tkanek wewnętrznych. Ponadto mogą zapewnić odpowiedzi na określone pytania dotyczące charakteru działania. Modele te mogą stanowić podstawę ekstrapolacji w odniesieniu do gatunku, dróg narażenia i schematów dawkowania oraz podstawę oceny ryzyka dla ludzi. Dane przydatne do opracowania fizjologicznych modeli toksykokinetycznych (PBTK) dla badanej substancji chemicznej podawanej danemu gatunkowi obejmują 1) współczynniki podziału; 2) stałe biochemiczne i parametry fizjologiczne; 3) parametry wchłaniania dla poszczególnych dróg narażenia; oraz 4) dane kinetyczne *in vivo* do oceny modelu [np. parametry klirensu dla odpowiednich (> 10 %) dróg wydalania, K_m i V_{max} dla metabolizmu]. Dane doświadczalne wykorzystane do opracowywania modelu należy wygenerować za pomocą wiarygodnych naukowo metod, a wyniki modelu poddać walidacji. Parametry specyficzne dla badanej substancji chemicznej i gatunku, takie jak: współczynniki wchłaniania, podział krew-tkanka i stałe metaboliczne, często określa się w celu ułatwienia opracowania modeli nieopartych na przedziałach lub modeli fizjologicznych (7).

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

66. Zaleca się, aby sprawozdanie z badania zawierało spis treści.

Treść sprawozdania

67. Treść sprawozdania powinna obejmować informacje uwzględnione w niniejszej metodzie badawczej, które należy uporządkować w sekcje i punkty w następujący sposób:

Streszczenie

68. Ta sekcja sprawozdania z badania powinna zawierać streszczenie projektu badania i opis zastosowanych metod. Należy w niej również podkreślić kluczowe wyniki dotyczące bilansu masy, charakteru i ilości metabolitów, pozostałości w tkankach, klirensu, potencjału bioakumulacji, różnic związanych z płcią itd. Streszczenie należy przedstawić w sposób na tyle szczegółowy, aby umożliwić ocenę wyników.

Wprowadzenie

69. Ta sekcja sprawozdania powinna obejmować cele badania, jego uzasadnienie i projekt, a także odpowiednie źródła i informacje wprowadzające.

Materiały i metody

70. Ta sekcja sprawozdania powinna zawierać szczegółowy opis wszystkich istotnych informacji, w tym:

a) Badana substancja chemiczna

Ta podsekcja powinna zawierać identyfikację badanej substancji chemicznej: nazwę chemiczną, strukturę molekularną, jakościowe i ilościowe oznaczenie jej składu chemicznego, czystość chemiczną i w miarę możliwości rodzaj i ilości jakichkolwiek zanieczyszczeń. Powinna również obejmować informacje dotyczące właściwości fizykochemicznych, w tym stanu skupienia, barwy, całkowitej rozpuszczalności lub współczynnika podziału, stabilności oraz w stosownych przypadkach działania żrącego. W stosownych przypadkach należy przedstawić informacje na temat izomerów. Jeżeli badana substancja chemiczna jest znakowana izotopowo, w tej podsekcji należy podać następujące informacje: typ nuklidu promieniotwórczego, pozycję znacznika, aktywność właściwą i czystość radiochemiczną.

Należy podać typ lub opis wszelkich nośników, rozpuszczalników, nośników zawiesin oraz emulgatorów lub innych materiałów wykorzystywanych do podawania badanej substancji chemicznej.

b) Badane zwierzęta

Ta podsekcja powinna zawierać informacje na temat badanych zwierząt, w tym dotyczące wyboru i uzasadnienia wyboru gatunku, szczepu i wieku w chwili rozpoczęcia badania, płci, jak również masy ciała, stanu zdrowia i hodowli.

c) Metody

Ta podsekcja powinna zawierać szczegółowe informacje na temat projektu badania i zastosowanej metodyki. Powinna obejmować opis:

- (1) w stosownych przypadkach – uzasadnienia wszelkich zmian drogi narażenia i warunków narażenia;

- (2) uzasadnienia wyboru poziomów dawkowania;
- (3) w stosownych przypadkach – opis badań pilotażowych wykorzystanych w układzie doświadczalnym dalszych badań. Należy przedstawić dane potwierdzające badanie pilotażowe;
- (4) sposobu przygotowywania roztworów dawek oraz rodzaju rozpuszczalnika lub nośnika, jeżeli został użyty;
- (5) liczby grup badanych i liczby zwierząt na grupę;
- (6) poziomów dawkowania i objętości dawek (oraz aktywności właściwej dawki w przypadku zastosowania izotopów promieniotwórczych);
- (7) drogi i metody podawania;
- (8) częstotliwości dawkowania;
- (9) okresu wstrzymania podawania pokarmu (jeżeli zastosowano);
- (10) promieniotwórczości na zwierzę ogółem;
- (11) postępowania ze zwierzętami;
- (12) pobierania próbek i postępowania z nimi;
- (13) metod analitycznych wykorzystanych w celu oddzielenia, pomiaru ilościowego i identyfikacji metabolitów;
- (14) granicy wykrywalności w odniesieniu do zastosowanych metod;
- (15) innych zastosowanych pomiarów i procedur doświadczalnych (w tym walidacji metod wykorzystanych do analizy metabolitów).

d) Analiza statystyczna

Jeżeli do analizy wyników badania zastosowano analizę statystyczną, wówczas sprawozdanie powinno zawierać wystarczające informacje dotyczące użytych metod analizy i oprogramowania komputerowego, tak aby niezależny recenzent/statystyk mógł dokonać powtórnej oceny i odtworzyć analizę.

W przypadku badań z wykorzystaniem modeli układów, takich jak fizjologiczny model toksykokinetyczny (PBTK), prezentacja modeli powinna obejmować pełny opis modelu, aby umożliwić jego niezależną rekonstrukcję i walidację (zob. pkt 65 i dodatek: Definicje).

Wyniki

71. Wszystkie dane należy zestawić w formie tabeli z odpowiednią oceną statystyczną oraz opisać w tekście tej sekcji. Dane z pomiarów promieniotwórczości należy streścić i przedstawić w formie odpowiedniej dla badania, zwykle w ekwiwalentach mikrogramów lub miligramów na masę próbki, chociaż można zastosować także inne jednostki. Sekcja ta powinna zawierać ilustracje graficzne wyników, kopię reprezentatywnych danych chromatograficznych i spektrometrycznych, nazwy/oznaczenie ilościowe metabolitów oraz proponowane szlaki metaboliczne, w tym strukturę molekularną metabolitów. Ponadto w stosownych przypadkach należy zawrzeć w tej sekcji następujące informacje:

- (1) ilość i procent odzysku promieniotwórczości w moczu, kale, wydychanym powietrzu oraz w płynach pozostałych po myciu klatek z moczu i kału.
 - w przypadku badań z zastosowaniem dermalnej drogi podania należy również uwzględnić dane dotyczące odzysku badanej substancji chemicznej ze skóry poddanej działaniu substancji i płynów pozostałych po przemywaniu skóry oraz rezydualnej promieniotwórczości w skórze, opisując przy tym urządzenie i jednostkę metaboliczną, a także wyniki badania przemywania skóry. Dalsze omówienie – zob. pkt 74–77,
 - w przypadku badań z zastosowaniem inhalacyjnej drogi podania należy również uwzględnić dane dotyczące odzysku badanej substancji chemicznej z płuc i tkanek nosa (8). Dalsze omówienie – zob. pkt 78;

- (2) dystrybucję w tkankach, wyrażoną jako procent podanej dawki i stężenia (w ekwiwalentach mikrogramów na gram tkanki), oraz proporcje tkanki do krwi lub tkanki do osocza;
- (3) bilans materiałowy opracowany na podstawie każdego badania wiążącego się z testami tkanek ciała i wydalini;
- (4) stężenie w osoczu i parametry toksykokinetyczne (biodostępność, pole pod krzywą, C_{max} , T_{max} , klirens, okres półtrwania) po podaniu właściwą drogą (drogami) narażenia;
- (5) szybkość i stopień wchłaniania badanej substancji chemicznej po podaniu właściwą drogą (drogami) narażenia;
- (6) ilości badanej substancji chemicznej i metabolitów (wyrażone jako procent podanej dawki) zebranych w wydalinach;
- (7) odniesienie do danych w załączeniu, zawierających dane dotyczące poszczególnych zwierząt w odniesieniu do wszystkich punktów końcowych pomiarów (np. dawkowanie, procent odzysku, stężenia, parametry toksykokinetyczne itp.);
- (8) rysunek, na którym przedstawione są proponowane szlaki metaboliczne i struktura molekularna metabolitów.

Omówienie i wnioski

72. W tej sekcji autor lub autorzy powinni:

- (1) podać proponowany szlak metaboliczny na podstawie wyników metabolizmu i rozmieszczenia badanej substancji chemicznej;
- (2) omówić ewentualne różnice między gatunkami i płciami pod względem rozmieszczenia lub biotransformacji badanej substancji chemicznej;
- (3) zestawić w formie tabeli i omówić w stosownych przypadkach rodzaj i ilość metabolitów, klirens, potencjał bioakumulacji oraz poziom pozostałości związku macierzystego lub metabolitów w tkankach, a także możliwe zmiany parametrów toksykokinetycznych uwarunkowane dawką;
- (4) włączyć do tej sekcji wszelkie istotne dane toksykokinetyczne uzyskane w trakcie prowadzenia badań toksyczności;
- (5) podać zwięzłą konkluzję, którą mogą potwierdzać wyniki badania;
- (6) dodać sekcje (w razie potrzeby lub w stosownych przypadkach).

73. Dodatkowe sekcje należy wykorzystać do zamieszczenia potwierdzających danych bibliograficznych, tabel, rysunków, dodatków itp.

ALTERNATYWNE DROGI NARAŻENIA

Droga dermalna

Poddawanie działaniu substancji drogą dermalną

74. Niniejsza sekcja zawiera szczegółowe informacje na temat badania toksykokinetyki badanej substancji chemicznej podawanej drogą dermalną. W odniesieniu do wchłaniania przez skórę należy zapoznać się z rozdziałem B.44 niniejszego załącznika [Absorpcja przez skórę: metoda *in vivo* (9)]. W przypadku innych punktów końcowych, takich jak dystrybucja i metabolizm, można stosować niniejszą metodę badawczą B.36. Przy poddawaniu działaniu badanej substancji chemicznej drogą dermalną należy zastosować co najmniej jeden poziom dawkowania. Badana substancja chemiczna (np. czysty, rozcieńczony lub zmieszany materiał zawierający badaną substancję chemiczną, który nakładany jest na skórę) powinna być taka sama (lub być realistycznym surogatem) jak substancja, na której działanie narażenia mogą być ludzie lub inne potencjalne gatunki docelowe. Poziom (poziomy) dawkowania należy wybrać zgodnie z pkt 20–26 niniejszej metody badawczej. Czynniki, które można wziąć pod uwagę przy doborze dawki na skórę, obejmują oczekiwane narażenie ludzi lub dawki, przy których w innych badaniach toksyczności dermalnej zaobserwowano toksyczność. Dawka (dawki) na skórę należy w razie potrzeby rozpuścić w odpowiednim nośniku i aplikować w ilości odpowiedniej do dostarczenia dawki. Tuż przed badaniem należy wystrzyć sierść na grzbietowej powierzchni tułowia badanych zwierząt. Można zastosować golenie, lecz należy je przeprowadzić około 24 godziny przed rozpoczęciem badania. Podczas przycinania lub golenia sierści należy uważać, aby nie uszkodzić skóry, gdyż mogłoby to

zmienić jej przepuszczalność. Na potrzeby zastosowania badanej substancji chemicznej należy usunąć sierść z ok. 10 % powierzchni ciała. W przypadku substancji wysoce toksycznych można je nanieść na powierzchnię mniejszą niż ok. 10 %, jednak należy dążyć do tego, aby pokryć jak największy obszar cienką i równomierną warstwą. We wszystkich grupach w badaniu narażenia dermalnego należy wykorzystać taką samą powierzchnię poddawania działaniu substancji. Powierzchnię, na którą dawkowana jest substancja, trzeba chronić odpowiednią dobrze umocowaną osłoną. Zwierzęta powinny być trzymane oddzielnie.

75. Należy przeprowadzić badanie przemywania skóry w celu oszacowania ilości aplikowanej dawki badanej substancji chemicznej, którą można usunąć ze skóry przez umycie łagodnym mydłem i wodą powierzchni skóry poddanej działaniu tej substancji. Badanie to może również pomóc w określeniu bilansu masy, gdy badana substancja chemiczna podawana jest drogą dermalną. Dla celów tego badania przemywania skóry należy dwóm zwierzętom podać pojedynczą dawkę badanej substancji chemicznej. Wyboru poziomu dawkowania dokonuje się zgodnie z pkt 23 niniejszej metody badawczej (zob. również pkt 76, w którym omówiono czas kontaktu ze skórą). Ilości badanej substancji chemicznej odzyskane w płynach pozostałych po przemywaniu należy określić, aby oszacować skuteczność usuwania tej substancji poprzez mycie.
76. Badaną substancję chemiczną należy nałożyć na skórę i trzymać przez co najmniej 6 godzin, o ile nie uniemożliwia tego działanie żrące tej substancji. Po zdjęciu osłony obszar poddany działaniu substancji należy umyć zgodnie z procedurą określoną w badaniu przemywania skóry (zob. pkt 75). Zarówno osłonę, jak i płyny pozostałe po przemywaniu należy poddać analizie pod kątem pozostałości badanej substancji chemicznej. Na zakończenie badania każde zwierzę należy humanitarnie uśmiercić zgodnie z (2) i usunąć skórę poddawaną działaniu substancji. Odpowiedni wycinek tej skóry należy poddać analizie w celu określenia pozostałości badanej substancji chemicznej (promieniotwórczości).
77. Dla celów toksykokinetycznej oceny produktów farmaceutycznych potrzebne mogą być odmienne procedury, zgodne z odpowiednim systemem regulacji.

Droga inhalacyjna

78. Należy zastosować jedno stężenie (lub w razie potrzeby większą liczbę stężeń) badanej substancji chemicznej. Stężenie (stężenia) należy wybrać zgodnie z pkt 20–26 niniejszej metody badawczej. Zabiegi poddawania działaniu substancji drogą inhalacyjną należy przeprowadzać przy użyciu przyrządu z maską inhalacyjną umożliwiającą narażenie tylko przez nos lub tylko głowy, aby zapobiec wchłanianiu substancji innymi drogami narażenia (8). Jeżeli stosowane są inne warunki narażenia inhalacyjnego, należy udokumentować uzasadnienie zmiany procedury. Czas trwania narażenia drogą inhalacyjną powinien być określony; typowe narażenie trwa 4–6 h.

BIBLIOGRAFIA:

- (1) OECD (2009). Preliminary Review of OECD Test Guidelines for their Applicability to Manufactured Nanomaterials, Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials nr 15, ENV/JM/MONO(2009)21, OECD, Paryż.
- (2) OECD (2000). Guidance Document on Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation; Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment nr 19, ENV/JM/MONO(2000), OECD, Paryż.
- (3) Solon E G, Kraus L (2002). Quantitative whole-body autoradiography in the pharmaceutical industry; Survey results on study design, methods, and regulatory compliance, J Pharm and Tox Methods 46: 73–81.
- (4) Stumpf WE (2005). Drug localization and targeting with receptor microscopic autoradiography. J. Pharmacological and Toxicological Methods 51: 25–40.
- (5) Loizou G, Spendiff M, Barton HA, Bessems J, Bois FY, d'Yvoire MB, Buist H, Clewell HJ 3rd, Meek B, Gundert-Remy U, Goerlitz G, Schmitt W. (2008). Development of good modelling practice for physiologically based pharmacokinetic models for use in risk assessment: The first steps. Regulatory Toxicology and Pharmacology 50: 400–411.
- (6) Rozdział B.45 niniejszego załącznika. Absorpcja przez skórę: metoda *in vitro*.
- (7) IPCS (2010). Characterization and application of Physiologically-Based Pharmacokinetic Models in Risk Assessment. IPCS Harmonization Project Document nr 9. Genewa, Światowa Organizacja Zdrowia, Międzynarodowy Program Bezpieczeństwa Chemicznego.
- (8) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Series on Testing and Assessment nr 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paryż.

-
- (9) Rozdział B.44 niniejszego załącznika. Absorpcja przez skórę: metoda *in vivo*.
- (10) Barton HA, i in. (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments, *Critical Reviews in Toxicology* 36: 9–35.
- (11) Gibaldi M i Perrier D, (1982), *Pharmacokinetics*, wyd. drugie, Marcel Dekker, Inc., Nowy Jork.
-

Dodatek

DEFINICJE

Wchłanianie: proces absorpcji chemikaliów w głąb tkanek lub przez tkanki. Wchłanianie dotyczy związku macierzystego i wszystkich jego metabolitów. Nie mylić z »biodostępnością«.

Akumulacja (bioakumulacja): wzrost ilości badanej substancji chemicznej w czasie w tkankach (zwykle tkankach tłuszczowych w następstwie powtarzanego narażenia); jeśli ilość badanej substancji chemicznej wprowadzana do organizmu jest większa niż szybkość, z jaką jest wydalana, organizm gromadzi tę substancję i może dojść do osiągnięcia toksycznego stężenia badanej substancji chemicznej.

ADME: akronim »Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion« (ang. wchłanianie, dystrybucja, metabolizm i wydalanie).

AUC: (pole pod krzywą stężenia w osoczu w czasie): pole pod krzywą na wykresie stężenia badanej substancji chemicznej w osoczu w czasie. Oznacza ono całkowitą ilość badanej substancji chemicznej wchłoniętą przez organizm we wcześniej określonym czasie. W warunkach liniowych AUC (od czasu zerowego do nieskończoności) jest proporcjonalne do całkowitej ilości badanej substancji chemicznej wchłoniętej przez organizm, niezależnie od tempa wchłaniania.

Autoradiografia: (autoradiografia całego ciała): stosowana w celu jakościowego lub ilościowego określenia umiejscowienia w tkankach badanej promieniotwórczej substancji chemicznej; w technice tej wykorzystuje się kliszę rentgenowską lub - od niedawna - obrazowanie cyfrowe z użyciem fosforu w celu zwizualizowania radioaktywnie znakowanych cząsteczek lub fragmentów cząsteczek poprzez rejestrowanie promieniowania emitowanego w badanym obiekcie. W porównaniu z sekcją narządów ilościowa autoradiografia całego ciała może mieć pewne zalety dla oceny dystrybucji badanej substancji chemicznej oraz oceny całkowitego odzysku i rozkładu materiału promieniotwórczego w tkankach. Jedną z istotnych zalet jest na przykład to, że autoradiografia może być stosowana na zabarwionym modelu zwierzęcym w celu oceny ewentualnego łączenia się badanej substancji chemicznej z melaniną, która może wiązać się z pewnymi cząsteczkami. Mimo że technika ta może zapewnić obejmujący całe ciało wygodny przegląd miejsc wiązania o dużej zdolności i niskim powinowactwie, może ona jednak być ograniczona pod względem rozpoznawania swoistych miejsc docelowych, takich jak miejsca wiązania receptorów, gdzie wykrycie wymaga stosunkowo wysokiej rozdzielczości oraz wysokiej czułości. W przypadku korzystania z autoradiografii doświadczenia mające na celu określenie bilansu masy podawanego związku należy przeprowadzać jako odrębną grupę lub w ramach oddzielnego badania, począwszy od doświadczenia dotyczącego dystrybucji w tkankach, polegającego na homogenizacji wszystkich wydalain (które mogą również obejmować wydychane powietrze) i całych ciał oraz poddaniu ich analizie za pomocą scyntylacyjnego licznika cieczowego.

Wydalanie z żółcią: wydalanie z dróg żółciowych.

Bioakumulacja: zob. »akumulacja«.

Biodostępność: ułamek podanej dawki, jaki dociera do krążenia ogólnego lub jest udostępniany na miejscu aktywności fizjologicznej. Zazwyczaj biodostępność badanej substancji chemicznej odnosi się do związku macierzystego, lecz może dotyczyć też jego metabolitu. Uwzględnia się w jej ramach tylko jedną formę chemiczną. *Uwaga:* biodostępność i wchłanianie nie są tożsame. Różnica między np. wchłanianiem po podaniu doustnym (tj. obecnością w ścianie jelita i krążeniu wrotnym) a biodostępnością (tj. obecnością w krwi w krążeniu ogólnym i w tkankach) może być spowodowana między innymi rozkładem chemicznym wskutek metabolizmu w ścianie jelita lub wypływu z powrotem do światła jelita lub pierwszym przejściem przez wątrobę (10). Biodostępność składnika toksycznego (związku macierzystego lub metabolitu) jest krytycznym parametrem w ocenie ryzyka dla ludzi (ekstrapolacja dawki dużej do małej, ekstrapolacja drogi do drogi), służącym wyprowadzeniu wartości wewnętrznej z zewnętrznego NOAEL lub BMD (zastosowana dawka). W odniesieniu do skutków dla wątroby po podaniu drogą pokarmową wystarcza wchłanianie po podaniu doustnym, jednak dla każdego skutku innego niż występujący w miejscu wprowadzenia danej substancji to biodostępność, nie wchłanianie, jest na ogół bardziej wiarygodnym parametrem na potrzeby dalszego zastosowania w ocenie ryzyka.

Biotrwałość: zob. »trwałość«.

Biotransformacja: (zwykle enzymatyczna) przemiana chemiczna badanej substancji chemicznej w inną substancję chemiczną zachodząca w ciele. Synonim »metabolizmu«.

C_{max}: maksymalne (szczytowe) stężenie we krwi (osoczu/surowicy krwi) po podaniu lub maksymalne (szczytowe) wydalanie (z moczem lub kałem) po podaniu.

Klirens: ilościowa miara szybkości, z jaką badana substancja chemiczna jest usuwana z krwi, osocza lub określonej tkanki w jednostce czasu.

Przedział: strukturalna lub biochemiczna część (lub jednostka) ciała, tkanki lub komórki, która jest oddzielona od reszty.

Ścieżki detoksykacji: szereg etapów prowadzących do eliminacji toksycznych chemikaliów z organizmu poprzez przemianę metaboliczną lub wydalanie.

Dystrybucja: rozproszenie badanej substancji chemicznej i jej pochodnych w całym organizmie.

Enzymy/izoenzymy: białka, które katalizują reakcje chemiczne. Izoenzymy są enzymami, które katalizują podobne reakcje chemiczne, lecz różnią się sekwencją aminokwasów.

Parametry enzymatyczne: K_m : stała Michaelisa oraz V_{max} : prędkość maksymalna.

Wydalanie: proces lub procesy, w drodze których podana badana substancja chemiczna lub jej metabolity są usuwane z organizmu

Egzogennie: wprowadzony spoza organizmu lub układu lub wytworzony poza nimi.

Ekstrapolacja: wywodzenie jednej nieznannej wartości lub większej ich liczby w oparciu o to, co jest znane lub zostało zaobserwowane.

Okres półtrwania ($t_{1/2}$): czas, jaki musi upłynąć, by stężenie badanej substancji chemicznej zmniejszyło się o połowę w danym przedziale. Zazwyczaj odnosi się do stężenia w osoczu lub ilości badanej substancji chemicznej w całym organizmie.

Indukcja/indukcja enzymatyczna: synteza enzymów w odpowiedzi na bodziec środowiskowy lub cząsteczkę induktora.

Liniowość/kinetyka liniowa: proces jest liniowy pod względem kinetyki, gdy wszystkie prędkości wnikania między przedziałami są proporcjonalne do obecnych ilości lub stężeń, tj. są pierwszego rzędu. W związku z tym wartości klirensu i dystrybucji są stałe, podobnie jak okresy półtrwania. Osiągane stężenia są proporcjonalne do szybkości dawkowania (narażenia), a akumulacja jest łatwiejsza do przewidzenia. Liniowość/nieliniowość można ocenić przez porównanie odpowiednich parametrów, np. pola pod krzywą po różnych dawkach lub po narażeniu jednorazowym i powtarzanym. Brak zależności od dawki może wskazywać na nasycenie enzymów biorących udział w metabolizmie danego związku chemicznego, zwiększenie pola pod krzywą po powtarzanym narażeniu w porównaniu z narażeniem jednorazowym może świadczyć o zhamowaniu metabolizmu, a zmniejszenie pola pod krzywą może być oznaką indukcji metabolizmu [zob. również (11)].

Bilans masy: rozliczanie badanej substancji chemicznej wchodzącej do układu i wychodzącej z niego.

Bilans materiałowy: zob. »bilans masy«.

Mechanizm (charakter) toksyczności/mechanizm (charakter) działania: mechanizm działania odnosi się do konkretnych interakcji biochemicznych, przez które badana substancja chemiczna powoduje swój skutek. Charakter działania odnosi się do bardziej ogólnych szlaków prowadzących do toksyczności badanej substancji chemicznej.

Metabolizm: synonim »biotransformacji«.

Metabolity: produkty metabolizmu lub procesów metabolicznych.

Wchłanianie po podaniu doustnym: procent dawki badanej substancji chemicznej wchłonięty z miejsca podania (tj. z przewodu pokarmowego). Ten krytyczny parametr można wykorzystać, aby dowiedzieć się, jaki ułamek podanej badanej substancji chemicznej dociera do żyły wrotnej, a później do wątroby.

Współczynnik podziału: znany także jako współczynnik dystrybucji, jest miarą różnicowej rozpuszczalności substancji chemicznej w dwóch rozpuszczalnikach.

Szczytowe poziomy stężenia we krwi (osoczu/surowicy krwi): maksymalne (szczytowe) stężenie we krwi (osoczu/surowicy krwi) po podaniu (zob. także » C_{max} «).

Trwałość (biotrwałość): długotrwała obecność substancji chemicznej (w układzie biologicznym) ze względu na odporność na rozkład/eliminację.

Przekrój: informacje na temat punktu końcowego jednej substancji chemicznej lub większej ich liczby są wykorzystywane do przewidywania punktu końcowego docelowej substancji chemicznej.

Mikroskopowa autoradiografia receptorowa (lub mikroautoradiografia receptorowa): technika ta może być wykorzystywana do badania interakcji ksenobiotyków z określonymi miejscami tkanek lub populacjami komórek, jak na przykład w badaniach dotyczących wiązania receptorów lub określonego charakteru działania, które mogą wymagać wysokiej rozdzielczości oraz wysokiej czułości, jakie mogą być niemożliwe do osiągnięcia przy użyciu innych technik, takich jak autoradiografia całego ciała.

Droga podania (doustna, dożylna, dermalna, inhalacyjna itp.): odnosi się do sposobu wprowadzenia substancji chemicznych do ciała (np. doustnie za pomocą sondy, doustnie z pokarmem, przez skórę, przez drogi oddechowe, dożylnie itd.).

Nasylenie: stan, w którym co najmniej jeden z procesów kinetycznych (np. wchłanianie, metabolizm lub klirens) ma wartość maksymalną (odczyt »nasycony«).

Czułość: zdolność metody lub instrumentu do rozróżniania reakcji pomiarowych reprezentujących różne poziomy przedmiotowej zmiennej.

Poziomy stężenia we krwi (osoczu) w stanie ustalonym: stan nierównowagi otwartego układu, w którym wszystkie siły działające na ten układ są dokładnie równoważone przez siły przeciwstawne w taki sposób, że wszystkie jego elementy mają niezmiennie stężenie, mimo że substancja płynie przez układ.

Modelowanie układów (fizjologiczny model toksykokinetyczny, model farmakokinetyczny, farmakokinetycznymodel fizjologiczny, model biologiczny itp.): abstrakcyjny model, w którym używa się języka matematycznego do opisu zachowania układu.

Tkanka docelowa: tkanka, w której przejawia się główne szkodliwe działanie substancji toksycznej.

Badana substancja chemiczna: jakakolwiek substancja chemiczna lub mieszanina badana za pomocą niniejszej metody badawczej.

Dystrybucja w tkankach: odwracalny ruch badanej substancji chemicznej z jednego miejsca w ciele do drugiego. Dystrybucję w tkankach można badać poprzez wycięcie organów, ich homogenizację, spalanie i poddanie analizie za pomocą scyntylacyjnego licznika cieczowego bądź też jakościową lub ilościową autoradiografię całego ciała. Pierwsza z tych metod jest przydatna do uzyskania stężenia i procentu odzysku z tkanek i reszty ciała takich samych zwierząt, lecz może nie mieć rozdzielczości pozwalającej na zbadanie wszystkich tkanek, a całkowity odzysk może być mniejszy niż w warunkach idealnych (< 90 %). Zob. definicja drugiej metody powyżej.

T_{max}: czas do osiągnięcia C_{max}.

Toksykokinetyka (farmakokinetyka): badanie wchłanianie, dystrybucji, metabolizmu i wydalania substancji chemicznych względem czasu.

Walidacja modeli: proces oceny odpowiedniości modelu do spójnego opisanie dostępnych danych toksykokinetycznych. Modele mogą być oceniane poprzez statystyczne i wizualne porównanie modelowych prognoz z wartościami doświadczalnymi w stosunku do wspólnej zmiennej niezależnej (np. czasu). Należy uzasadnić zakres oceny w odniesieniu do zamierzonego zastosowania modelu.”

8) dodaje się rozdział B.52:

„B.52. OSTRA TOKSYCZNOŚĆ INHALACYJNA – METODA KLAS OSTREJ TOKSYCZNOŚCI

WPROWADZENIE

1. Niniejsza metoda badawcza jest równoważna dotyczącej badań wytycznej OECD nr 436 (2009). Dotyczącą badań ostrej toksyczności inhalacyjnej wytyczną nr 403 przyjęto po raz pierwszy w 1981 r., następnie jednak wprowadzono do niej zmiany (zob. rozdział B.2 niniejszego załącznika (1)). Opracowanie metody klas ostrej toksyczności dla toksyczności inhalacyjnej (2) (3) (4) uznano za właściwe po przyjęciu zmienionej metody klas ostrej toksyczności dla toksyczności doustnej (rozdział B.1 tris niniejszego załącznika) (5). Retrospektywna ocena działania badawczej metody klas ostrej toksyczności dla ostrej toksyczności inhalacyjnej wykazała, że metoda ta jest odpowiednia do zastosowania na potrzeby klasyfikacji i oznakowania (6). Badawcza metoda klas ostrej toksyczności dla toksyczności inhalacyjnej pozwoli na przeprowadzenie szeregu działań z zastosowaniem określonych stężeń docelowych w celu ustanowienia klasyfikacji toksyczności badanej substancji chemicznej. Jako kluczowy punkt końcowy stosuje się śmiertelność, jednak zwierzęta doświadczające silnego bólu lub stresu, cierpiące lub które nieuchronnie czeka zgon, należy w humanitarny sposób uśmiercić w celu zminimalizowania ich cierpienia. Wytyczne dotyczące humanitarnego punktu końcowego są dostępne w wytycznych OECD nr 19 (7).
2. Wytyczne dotyczące przeprowadzania i interpretacji wyników niniejszej metody badawczej można znaleźć w dotyczących badania ostrej toksyczności inhalacyjnej wytycznych nr 39 (GD 39) (8).
3. Definicje zastosowane w kontekście niniejszej metody badawczej przedstawiono w dodatku 1 oraz w GD 39 (8).
4. Niniejsza metoda badawcza umożliwia uzyskanie informacji na temat niebezpiecznych właściwości badanej substancji chemicznej oraz pozwala na jej ocenę i klasyfikację zgodnie z rozporządzeniem (WE) nr 1272/2008 dotyczącym klasyfikacji substancji chemicznych powodujących ostrą toksyczność (9). Jeśli wymagana jest estymacja punktowa wartości LC₅₀ lub analizy zależności stężenie-odpowiedź, odpowiednią metodą badawczą, jaką należy zastosować, jest metoda opisana w rozdziale B.2 niniejszego załącznika (1). Dalsze wytyczne dotyczące wyboru metody badawczej można znaleźć w GD 39 (8). Niniejsza metoda badawcza nie jest w szczególności przeznaczona do badania materiałów specjalnych, takich jak słabo rozpuszczalne materiały izometryczne lub włókniste czy też wytworzone nanomateriały.

ZAŁOŻENIA WSTĘPNE

5. Aby zminimalizować wykorzystanie zwierząt, przed rozważeniem wykonania badania według niniejszej metody badawczej laboratorium badawcze powinno wziąć pod uwagę wszystkie dostępne informacje na temat badanej substancji chemicznej, w tym wyniki istniejących badań, dzięki którym można byłoby uniknąć wykonywania dodatkowych badań. Informacje, które mogą być pomocne w doborze najbardziej odpowiedniego gatunku, szczepu, płci, sposobu narażenia oraz odpowiednich stężeń do badania obejmują nazwę, strukturę chemiczną i właściwości fizykochemiczne badanej substancji chemicznej; wyniki wszelkich badań toksyczności *in vitro* lub *in vivo*; spodziewane zastosowania i potencjalne narażenie ludzi; dostępne dane dotyczące (Q)SAR oraz dane toksykologiczne na temat strukturalnie powiązanych związków. Stężeń, w przypadku których przewiduje się, że powodują silny ból i stres z powodu swojego działania żrącego⁽¹⁾ lub silnie drażniącego, nie należy badać za pomocą niniejszej metody badawczej [zob. GD 39 (8)].

ZASADA BADANIA

6. Zasada niniejszego badania polega na uzyskaniu wystarczających informacji na temat ostrej toksyczności inhalacyjnej badanej substancji chemicznej za pomocą procedury sekwencyjnej podczas okresu narażenia trwającego 4 godziny, w celu umożliwienia jej klasyfikacji. Dla poszczególnych celów regulacyjnych mogą obowiązywać inne czasy trwania narażenia. Na każdym etapie badania z określonym stężeniem bada się 3 zwierzęta każdej płci. W zależności od upadkowości lub stanu agonalnego zwierząt do stwierdzenia ostrej toksyczności badanej substancji chemicznej mogą wystarczyć 2 etapy. Jeśli udowodniono, że jedna z płci jest bardziej podatna na działanie substancji, badanie można kontynuować z wykorzystaniem jedynie osobników takiej bardziej podatnej płci. Wynik poprzedniego etapu określi działania w ramach kolejnego etapu, na przykład:
 - a) dalsze badania nie są konieczne;
 - b) badanie trzech zwierząt każdej płci; lub
 - c) badanie z wykorzystaniem 6 zwierząt jedynie płci bardziej podatnej na działanie substancji, tj. szacunki niższych wartości granicznych klasy toksyczności należy oprzeć na badaniach z wykorzystaniem 6 zwierząt w każdej grupie otrzymującej określone stężenie, niezależnie od płci takich zwierząt.
7. Zwierzęta w stanie agonalnym lub zwierzęta wykazujące oczywiste oznaki bólu czy oznaki ostrego i przewlekłego stresu powinny zostać uśmiercone w humanitarny sposób i uwzględnione w interpretacji wyników badań w ten sam sposób, co zwierzęta padłe w trakcie badania. Kryteria podejmowania decyzji co do uśmiercenia zwierząt w stanie agonalnym lub cierpiących silny ból oraz wytyczne dotyczące rozpoznawania przewidywanego lub nieuchronnie zbliżającego się zgonu zawarto w wytycznych OECD nr 19 dotyczących humanitarnego punktu końcowego (7).

OPIS METODY

Wybór gatunku zwierząt

8. Należy wykorzystać zdrowe, młode, dorosłe zwierzęta pochodzące ze szczepów powszechnie wykorzystywanych w laboratoriach. Preferowanym gatunkiem jest szczur, a w przypadku wykorzystania innego gatunku należy podać uzasadnienie.

Przygotowanie zwierząt

9. Samice powinny być nieródkami i nie mogą być w ciąży. W dniu narażenia zwierzęta powinny być młodymi dorosłymi osobnikami w wieku 8-12 tygodni, a ich masa ciała powinna mieścić się w zakresie $\pm 20\%$ średniej masy dla każdej płci zwierząt w tym samym wieku poddanych uprzednio narażeniu. Zwierzęta wybiera się losowo i oznacza w sposób umożliwiający identyfikację poszczególnych osobników. Zwierzęta przetrzymuje się w klatkach przez co najmniej 5 dni przed rozpoczęciem badania, aby umożliwić ich aklimatyzację do warunków laboratoryjnych. Zwierzęta powinny również być przyzwyczajane do przyrządów używanych w badaniu przez krótki okres przed rozpoczęciem badania, ponieważ zmniejszy to ich stres spowodowany wprowadzeniem do nowego środowiska.

Hodowla zwierząt

10. Temperatura w pomieszczeniach, w których przetrzymuje się zwierzęta doświadczalne, powinna wynosić 22 ± 3 °C. Najlepiej byłoby, gdyby wilgotność względna była utrzymywana w przedziale 30-70 %, chociaż może to być niemożliwe w przypadku stosowania wody jako nośnika. Przed narażeniem i po nim zwierzęta na ogół należy trzymać w klatkach w grupach podzielonych według płci i badanego stężenia, lecz liczba zwierząt w klatce nie powinna przeszkadzać w dokładnej obserwacji każdego zwierzęcia, a także powinna umożliwiać zminimalizowanie strat w zwierzętach spowodowanych kanibalizmem i walkami. Jeżeli zwierzęta mają być poddane narażeniu tylko przez nos, konieczne może być przyzwyczajenie ich do rur unieruchamiających. Rury unieruchamiające nie powinny powodować u zwierząt nadmiernego stresu fizycznego, termicznego ani stresu związanego z unieruchomieniem. Unieruchomienie może wpłynąć na fizjologiczne punkty końcowe, takie jak temperatura ciała (hipertermia) lub minutowa pojemność oddechowa. Jeżeli dostępne są dane ogólne, na podstawie których można wykazać, że takie zmiany nie występują w znaczącym stopniu, uprzednia

⁽¹⁾ Do oceny działania żrącego można wykorzystać ocenę specjalistyczną opartą na takich dowodach, jak: wyniki badań z udziałem ludzi lub zwierząt, istniejące dane (*in vitro*), np. rozdział B.40 (10), B.40 bis (11) niniejszego załącznika lub wytyczna OECD TG 435 (12), wartości pH, informacje dotyczące podobnych substancji chemicznych lub inne istotne dane.

adaptacja do rur unieruchamiających nie jest konieczna. Zwierzęta, których cała powierzchnia ciała jest narażana na działanie aerozolu, w trakcie narażenia powinny być trzymane oddzielnie, aby zapobiec filtrowaniu badanego aerozolu przez futro innych zwierząt w tej samej klatce. Można stosować konwencjonalne oraz certyfikowane pasze laboratoryjne, z wyjątkiem okresów poddawania narażeniu, podczas których stosuje się nieograniczony dostęp do wody pitnej z miejscowej instalacji wodociągowej. Oświetlenie powinno być sztuczne, w cyklu 12 godzin światła, 12 godzin ciemności.

Komory inhalacyjne

11. Przy wyborze komory inhalacyjnej należy wziąć pod uwagę charakter badanej substancji chemicznej i cel badania. Preferowaną drogą narażenia jest narażenie tylko przez nos (pojęcie to obejmuje narażenie tylko głowy, narażenie tylko przez nos lub narażenie tylko pyska). Narażenie tylko przez nos jest na ogół preferowane w badaniach aerozoli ciekłych lub stałych oraz par, które mogą skraplać się, tworząc aerozole. Narażenie całego ciała może lepiej sprzyjać osiągnięciu szczególnych celów badania, taki wybór należy jednak uzasadnić w sprawozdaniu z badania. Aby zagwarantować stabilność atmosfery przy zastosowaniu komory do poddawania narażeniu całego ciała, całkowita objętość badanych zwierząt nie powinna przekraczać 5 % objętości komory. Zasady technik narażenia tylko przez nos i przez powierzchnię całego ciała oraz ich szczególne zalety i wady omówiono w GD 39 (8).

WARUNKI NARAŻENIA NA DZIAŁANIE SUBSTANCJI

Stosowanie stężeń

12. Zaleca się stosowanie stałego okresu poddania narażeniu trwającego cztery godziny, z wyjątkiem okresu wyrównania stężeń. W przypadku konieczności spełnienia konkretnych wymogów można zastosować inne okresy trwania narażenia, należy to jednak uzasadnić w sprawozdaniu z badania [zob. GD 39 (8)]. Zwierzęta poddane działaniu aerozoli w komorach do poddawania narażeniu całego ciała należy przetrzymywać pojedynczo, aby zapobiec połknięciu badanej substancji chemicznej przy wylizywaniu innych zwierząt znajdujących się w tej samej klatce. W okresie narażenia na działanie substancji należy wstrzymać podawanie paszy. Podczas całego okresu poddawania narażeniu całego ciała można zapewnić dostęp do wody.
13. Zwierzęta są poddawane narażaniu na działanie badanej substancji chemicznej w formie gazu, pary, aerozolu lub mieszaniny tych postaci. Stan fizyczny, który ma być przedmiotem badania, zależy od właściwości fizykochemicznych badanej substancji chemicznej, wybranego stężenia lub formy fizycznej, która najprawdopodobniej będzie występować podczas postępowania z badaną substancją chemiczną i jej stosowania. Badane substancje chemiczne o charakterze higroskopijnym oraz reaktywne chemicznie należy badać w suchej atmosferze. Należy zachować ostrożność, aby uniknąć osiągnięcia stężenia wybuchowego.

Rozkład wielkości cząstek

14. W odniesieniu do wszystkich aerozoli oraz par, które mogą skraplać się, tworząc aerozole, należy dokonać klasyfikacji cząstek według wielkości. W celu umożliwienia narażenia na działanie danej substancji wszystkich odpowiednich części dróg oddechowych zaleca się aerozole o średnicy aerodynamicznej mediany rozkładu masy (MMAD) wynoszącej od 1 do 4 μm przy geometrycznym standardowym odchyleniu (σ_g) równym od 1,5 do 3,0 (8) (13) (14). Należy dołożyć uzasadnionych starań, aby spełnić tę normę, jednak w razie niemożności jej osiągnięcia należy przedstawić specjalistyczną opinię. Przykładowo pary metali mogą zawierać cząstki mniejsze niż przewiduje to norma, a cząstki naładowane, włókna i materiały higroskopijne (których rozmiar zwiększa się w wilgotnym środowisku układu oddechowego) mogą tę normę przekraczać.

Przygotowanie badanej substancji chemicznej w nośniku

15. Do uzyskania odpowiedniego stężenia i rozmiaru cząstek badanej substancji chemicznej w atmosferze można zastosować nośnik. Zasadniczo preferowanym nośnikiem powinna być woda. Materiały stałe można poddać obróbce mechanicznej w celu uzyskania wymaganego zróżnicowania wielkości cząstek, jednak należy zachować ostrożność, aby badana substancja chemiczna nie uległa rozkładowi ani zmianom. W przypadkach, w których można przypuszczać, że w wyniku procesów mechanicznych zmienił się skład badanej substancji chemicznej (np. w skrajnych temperaturach powstających na skutek tarcia przy nadmiernie intensywnym mieleniu), należy go zweryfikować metodami analitycznymi. Należy dołożyć odpowiednich starań, aby uniknąć zanieczyszczenia badanej substancji chemicznej. Nie ma potrzeby badania materiałów granulowanych niemających charakteru sypkiego, które są celowo przygotowywane tak, aby nie ulegały wdychaniu. Należy wykonać próbę na ścieranie w celu wykazania, że przy wykorzystywaniu materiału granulowanego nie powstają cząstki respirabilne. Jeżeli w wyniku próby na ścieranie powstaną cząstki respirabilne, należy wykonać badanie toksyczności inhalacyjnej.

Zwierzęta kontrolne

16. Wykorzystanie równoległej ujemnej (poddanej działaniu powietrza) grupy kontrolnej nie jest konieczne. W przypadku wykorzystania nośnika innego niż woda w celu wytworzenia atmosfery na potrzeby badania należy użyć grupy kontrolnej nośnika tylko wtedy, gdy brak jest dostępnych danych historycznych na temat toksyczności inhalacyjnej. Jeżeli badanie toksyczności dla badanej substancji chemicznej zmieszanej z nośnikiem nie wykaże toksyczności, wynika z tego, że dany nośnik jest nietoksyczny w badanych stężeniach, a zatem nie ma potrzeby tworzenia grupy kontrolnej nośnika.

MONITOROWANIE WARUNKÓW NARAŻENIA NA DZIAŁANIE SUBSTANCJI

Przepływ powietrza w komorze

17. Przepływ powietrza przez komorę należy starannie kontrolować i monitorować w sposób ciągły, jak również rejestrować podczas narażania na działanie substancji nie rzadziej niż co godzinę. Monitorowanie stężenia (lub stabilności) badanej substancji w atmosferze uzyskanej na potrzeby badania jest integralnym pomiarem wszystkich parametrów dynamicznych i umożliwia w sposób pośredni kontrolę wszystkich istotnych parametrów

dynamicznych w zakresie wytwarzania atmosfery. Należy w szczególności uwzględnić kwestię zapobiegania ponownemu wdychaniu w komorach przeznaczonych do narażenia wyłącznie przez nos w przypadkach, gdy przepływ powietrza przez układ podawania substancji jest nieodpowiedni do zapewnienia dynamicznego przepływu powietrza zawierającego badaną substancję chemiczną. Istnieją zalecane metody, które można zastosować do wykazania, że w wybranych warunkach ponowne wdychanie nie zachodzi (8) (15). Stężenie tlenu powinno wynosić co najmniej 19 %, a stężenie dwutlenku węgla nie powinno przekraczać 1 %. Jeżeli istnieją powody, by przypuszczać, że norma ta nie może zostać osiągnięta, należy zmierzyć stężenia tlenu i dwutlenku węgla.

Temperatura i wilgotność względna w komorze

18. W komorze należy utrzymywać temperaturę na poziomie 22 ± 3 °C. Wilgotność względną w strefie oddychania zwierząt – zarówno dla narażenia tylko przez nos, jak i dla narażenia całego ciała – należy monitorować i rejestrować co najmniej trzykrotnie podczas okresów poddawania działaniu substancji trwających do 4 godzin, a podczas okresów krótszych – co godzinę. Należy utrzymywać wilgotność względną w przedziale 30–70 %, choć może to być nieosiągalne (np. przy badaniu mieszanin opartych na wodzie) lub niemożliwe do zmierzenia w przypadku zakłócenia danej metody badawczej przez badaną substancję chemiczną.

Badana substancja chemiczna: stężenie nominalne

19. Tam, gdzie to możliwe, należy obliczyć i zarejestrować stężenie nominalne w komorze badawczej. Stężenie nominalne jest to masa wytworzonej badanej substancji chemicznej podzielona przez całkowitą objętość powietrza przepuszczonego przez system komory. Stężenie nominalne nie służy do charakteryzowania narażenia zwierząt, lecz porównanie stężenia nominalnego i stężenia rzeczywistego umożliwia określenie w przybliżeniu efektywności wytwarzania substancji badanej w układzie badawczym, a tym samym można je wykorzystać do wykrywania problemów związanych z takim wytwarzaniem.

Badana substancja chemiczna: stężenie rzeczywiste

20. Stężenie rzeczywiste jest to stężenie badanej substancji chemicznej w strefie oddychania zwierząt w komorze inhalacyjnej. Stężenie rzeczywiste można uzyskać za pomocą metod swoistych (np. bezpośredniego pobierania próbek, metod adsorpcji lub reakcji chemicznej, a następnie charakterystyki analitycznej) lub metod nieswoistych, takich jak analiza grawimetryczna przy zastosowaniu filtra. Zastosowanie metody grawimetrycznej jest akceptowalne tylko w przypadku aerozoli proszkowych zawierających jeden składnik lub aerozoli cieczy o niskiej lotności i należy wtedy przed badaniem wykonać odpowiednią, swoistą dla badanej substancji chemicznej charakterystykę. Za pomocą metody grawimetrycznej można również określić stężenie wieloskładnikowego aerozolu proszkowego. Do tego jednak konieczne są dane analityczne, za pomocą których można wykazać, że skład materiału znajdującego się w powietrzu jest podobny do składu materiału wyjściowego. W razie braku takich informacji może być konieczna ponowna analiza badanej substancji chemicznej (najlepiej znajdującej się w powietrzu) w toku badania, w regularnych odstępach czasowych. W przypadku środków w formie aerozoli, które mogą ulec odparowaniu lub sublimacji, należy wykazać, że stosując wybraną metodę, zebrano wszystkie fazy. W sprawozdaniu z badania należy podać stężenia docelowe, nominalne i rzeczywiste, ale w analizach statystycznych do wyliczenia wartości stężeń śmiertelnych uwzględnia się tylko stężenia rzeczywiste.
21. Jeżeli to możliwe, należy używać badanej substancji chemicznej pochodzącej z jednej partii, a badaną próbkę należy przechowywać w warunkach zapewniających jej czystość, jednorodność i stabilność. Przed rozpoczęciem badania należy scharakteryzować badaną substancję chemiczną, w tym określić jej czystość oraz, o ile jest to wykonalne z technicznego punktu widzenia, nazwę oraz ilości zidentyfikowanych domieszek i zanieczyszczeń. Można to wykazać, między innymi, za pomocą następujących danych: czasu retencji i względnej powierzchni sygnału, masy cząsteczkowej uzyskanej w drodze spektrometrii masowej lub chromatografii gazowej bądź innych oszacowań. Mimo że identyfikacja badanej próbki nie należy do obowiązków laboratorium badawczego, rozsądne może być potwierdzenie przez to laboratorium charakterystyki, którą przedstawił sponsor, przynajmniej w ograniczonym zakresie (np. co do koloru, cech fizycznych itp.).
22. Podczas narażenia należy utrzymywać możliwie niezmienną atmosferę i monitorować ją stale lub co pewien czas, w zależności od metody analitycznej. Jeżeli stosuje się pobieranie próbek co pewien czas, podczas czterogodzinnego badania należy pobierać próbki powietrza w komorze nie rzadziej niż dwa razy podczas badania. Jeżeli z powodu ograniczonej prędkości przepływu powietrza lub niskich stężeń jest to niemożliwe, można pobrać jedną próbkę na cały okres narażenia. W razie wystąpienia znacznych fluktuacji pomiędzy próbkami dla kolejnych badanych stężeń należy pobrać cztery próbki na okres narażenia. Wartości stężeń w komorze dla poszczególnych próbek nie powinny odbiegać od stężenia średniego w komorze o więcej niż ± 10 % w przypadku gazów i par oraz o więcej niż ± 20 % w przypadku aerozoli ciekłych lub stałych. Należy obliczyć i zapisać okres wyrównania stężeń w komorze (t_{95}). Czas trwania narażenia obejmuje czas wprowadzania badanej substancji chemicznej do komory przy uwzględnieniu czasu potrzebnego do osiągnięcia t_{95} . Wytyczne dotyczące szacowania t_{95} można znaleźć w GD 39 (8).
23. W przypadku bardzo złożonych mieszanin składających się z par/gazów i aerozoli (np. w przypadku atmosfer spalania i badanych substancji chemicznych wydzielanych ze specjalnych produktów/urządzeń do zastosowania końcowego) każda faza może zachowywać się inaczej w komorze inhalacyjnej, należy zatem wybrać co najmniej jedną substancję wskaźnikową (analit) z każdej fazy (para/gaz i aerosol) – zazwyczaj jest to główna substancja czynna mieszaniny. Jeżeli badana substancja chemiczna jest mieszaniną, należy podać stężenie analityczne w odniesieniu do całej mieszaniny, a nie tylko substancji czynnej lub składnika aktywnego (analitu). Dodatkowe informacje na temat stężeń rzeczywistych można znaleźć w GD 39 (8).

Badana substancja chemiczna: rozkład wielkości cząstek

24. Rozkład wielkości cząstek aerozoli należy określać co najmniej dwa razy podczas każdego czterogodzinnego okresu narażenia za pomocą impaktora kaskadowego lub innego instrumentu, takiego jak aerodynamiczny spektrometr pomiaru cząstek. Jeżeli można wykazać równoważność wyników uzyskanych za pośrednictwem impaktora kaskadowego lub innego instrumentu, to ten inny instrument może być stosowany przez cały okres badania. W celu potwierdzenia sprawności zatrzymywania cząstek przez instrument główny należy równoległe do tego instrumentu stosować drugie urządzenie, takie jak filtr grawimetryczny lub odpylacz/belkotka. Stężenie masowe uzyskane na podstawie analizy wielkości cząstek powinno mieścić się w rozsądnych granicach stężenia masowego uzyskanego poprzez analizę filtrów [zob. GD 39 (8)]. Jeśli można wykazać równoważność w początkowej fazie badania, dalsze pomiary potwierdzające można pominąć. Ze względu na dobrostan zwierząt należy podjąć środki mające na celu zminimalizowanie ilości danych niejednoznacznych, które mogą prowadzić do konieczności powtórzenia narażenia. Klasyfikację cząstek według wielkości należy przeprowadzić w odniesieniu do par, jeżeli istnieje jakakolwiek możliwość tworzenia się aerozolu wskutek kondensacji par lub jeśli cząstki są wykrywane w atmosferze parowej mającej potencjał tworzenia faz mieszanych (zob. pkt 14).

PROCEDURA**Badanie główne**

25. W każdym etapie wykorzystuje się trzy zwierzęta każdej płci lub sześć zwierząt płci bardziej podatnej na działanie substancji. Jeśli gatunki gryzoni inne niż szczury poddaje się narażeniu tylko przez nos, maksymalne okresy narażenia można dostosować, by zminimalizować charakterystyczny dla danego gatunku stres. Poziom stężenia do zastosowania w dawce wyjściowej wybiera się spośród jednego z czterech określonych poziomów i taki wyjściowy poziom stężenia powinien być poziomem, co do którego istnieje największe prawdopodobieństwo, że wywoła on toksyczność u niektórych ze zwierząt narażanych. Plany badania w przypadku gazów, par i aerozoli (przedstawione w dodatkach 2–4) przedstawiają badanie wartości granicznych dla kategorii z rozporządzenia CLP 1–4 (9) dla gazów (100, 500, 2 500, 20 000 ppm/4h) (dodatek 2), dla par (0,5; 2; 10; 20 mg/l/4h) (dodatek 3) i dla aerozoli (0,05; 0,5; 1; 5 mg/l/4h) (dodatek 4). Kategoria 5, której nie wdrożono rozporządzeniem (WE) nr 1272/2008 (9), dotyczy stężeń powyżej odpowiednich stężeń granicznych. Dla każdego stężenia wyjściowego stosuje się odpowiedni plan badania. W zależności od liczby zwierząt uśmierconych z powodów humanitarnych lub zwierząt padłych, procedurę badania przeprowadza się zgodnie ze wskazanymi strzałkami aż do etapu, na którym możliwe jest dokonanie kategoryzacji.
26. Odstępy czasowe między podawaniem dawek w każdej grupie poddawanej narażeniu określa się na podstawie czasu wystąpienia, długości trwania i ciężkości oznak toksyczności. Należy odwiec narażenie zwierząt przy kolejnym poziomie stężenia do momentu, gdy można w sposób uzasadniony uznać, że poprzednio badane zwierzęta przeżyły. Zaleca się przerwę długości trzech lub czterech dni między narażeniem z zastosowaniem kolejnych poziomów stężenia, w celu umożliwienia obserwacji opóźnionego działania toksycznego. Taki odstęp czasowy można odpowiednio dostosować, np. w przypadku niejednoznacznych reakcji.

Badanie graniczne

27. Badanie graniczne stosuje się wtedy, gdy badana substancja chemiczna jest znana lub można się spodziewać, że jest ona praktycznie nietoksyczna, tj. powoduje efekt toksyczny dopiero powyżej stężenia granicznego przewidzianego przepisami. Informacje na temat toksyczności badanej substancji chemicznej można uzyskać na podstawie wiedzy na temat podobnych zbadanych substancji lub podobnych mieszanin, z uwzględnieniem nazwy i zawartości procentowej składników, o których wiadomo, że mają znaczenie z punktu widzenia toksyczności. W sytuacji niewystarczającej ilości lub braku informacji na temat toksyczności badanej substancji chemicznej lub w przypadku gdy oczekuje się, że taka substancja jest toksyczna, należy przeprowadzić badanie główne [dalsze wytyczne można znaleźć w GD 39 (8)].
28. W ramach normalnej procedury narażeniu poddaje się trzy zwierzęta każdej płci, lub sześć zwierząt płci bardziej podatnej na działanie substancji, przy stężeniach na poziomie odpowiednio 20 000 ppm w przypadku gazów, 20 mg/l w przypadku pary i 5 mg/l w przypadku pyłów/mgieł (jeśli jest to osiągalne), co stanowi badanie graniczne w ramach niniejszej metody badawczej. Przy badaniu aerozoli celem podstawowym powinno być osiągnięcie cząstek o respirabilnych rozmiarach (np. średnica aerodynamiczna mediany rozkładu masowego (MMAD) na poziomie 1–4 µm). Jest to możliwe w przypadku większości badanych substancji chemicznych przy stężeniu 2 mg/l. Badanie aerozoli przy stężeniu większym niż 2 mg/l należy przeprowadzać tylko wtedy, jeśli można osiągnąć rozmiar cząstek umożliwiający ich wdychanie [zob. GD 39 (8)]. Zgodnie z GHS (16) w trosce o dobrostan zwierząt odradza się badania przy stężeniu wyższym niż stężenie graniczne. Badanie w ramach kategorii GHS 5 (16), która nie jest wdrażana rozporządzeniem (WE) nr 1272/2008 (9), należy brać pod uwagę tylko w przypadku znacznego prawdopodobieństwa, że wyniki takich badań przyniosą bezpośrednie korzyści dla ochrony zdrowia ludzi, a w sprawozdaniu z badania należy podać uzasadnienie. W przypadku badanych substancji chemicznych, które mogą spowodować wybuch, należy dołożyć starań w celu uniknięcia warunków sprzyjających wybuchowi. Aby uniknąć zbędnego wykorzystania zwierząt, należy przed badaniem granicznym przeprowadzić test próbny bez udziału zwierząt w celu upewnienia się, że warunki w komorze do przeprowadzenia badania granicznego są możliwe do osiągnięcia.

OBSERWACJE

29. Zwierzęta w trakcie okresu narażenia należy często poddawać obserwacji klinicznej. Po narażeniu należy prowadzić obserwacje kliniczne – w dniu narażenia co najmniej dwukrotnie, lub częściej, jeśli wskazuje na to reakcja zwierząt na poddawanie działaniu substancji, a po tym dniu co najmniej raz dziennie przez łącznie 14 dni. Długość okresu obserwacji nie jest określona, należy ją jednak ustalić na podstawie charakteru i czasu wystąpienia objawów klinicznych oraz długości okresu zdrowienia. Czas, w jakim pojawiają się i zanikają oznaki toksyczności, jest istotny, szczególnie w przypadku tendencji do występowania opóźnionych oznak toksyczności. Wszystkie obserwacje są systematycznie zapisywane w ewidencji prowadzonej osobno dla każdego zwierzęcia. Zwierzęta,

u których stwierdzono stan agonalny, oraz zwierzęta wykazujące objawy silnego bólu lub stresu należy ze względu na ich dobrostan uśmiercić w sposób humanitarny. Przy badaniu pod kątem klinicznych oznak toksyczności należy zachować ostrożność, aby nie pomylić początkowego złego wyglądu i przejściowych zmian oddechowych, będących skutkiem procedury narażenia, ze skutkami związanymi z poddawaniem zwierząt działaniu badanej substancji chemicznej. Należy przestrzegać zasad i kryteriów streszczonych w wytycznych dotyczących humanitarnego punktu końcowego (7). W przypadku uśmiercenia zwierząt z przyczyn humanitarnych lub stwierdzenia ich zgonu należy możliwie najdokładniej zapisać czas zgonu.

30. Obserwacje zwierząt w klatkach powinny obejmować zmiany skóry i sierści, oczu i błon śluzowych; jak również zmiany w układzie oddechowym i układzie krążenia, zmiany w autonomicznym i ośrodkowym układzie nerwowym oraz zmiany w aktywności somatycznej i sposobie zachowania. O ile to możliwe, należy odnotować rozróżnienie pomiędzy skutkami miejscowymi i ogólnoustrojowymi. Szczególną uwagę należy poświęcić obserwacjom drżenia, konwulsji, ślinotoku, biegunki, letargu, snu i śpiączki. Pomiar temperatury w odbycie może dostarczyć dodatkowych dowodów potwierdzających odruchowe spowolnienie oddechu lub hipo-/hipertermię w związku z poddawaniem działaniu substancji lub przetrzymywaniem w zamknięciu.

Masa ciała

31. Należy odnotowywać masy ciała poszczególnych zwierząt: raz podczas okresu aklimatyzacji, w dniu narażenia przed narażeniem (dzień 0), oraz przynajmniej w dniach 1, 3 i 7 (a następnie co tydzień), jak również w momencie zgonu lub eutanazji, jeśli nastąpi ona później niż w dniu 1. Masę ciała uznaje się za krytyczny wskaźnik toksyczności, zatem zwierzęta wykazujące stały spadek wagi na poziomie $\geq 20\%$, w porównaniu z wartościami przed badaniem, należy ściśle monitorować. Po zakończeniu okresu po narażeniu zwierzęta, które przeżyły, są ważone i humanitarnie uśmiercane.

Patologia

32. Wszystkie badane zwierzęta, w tym te, które padły podczas badań lub zostały poddane eutanazji i wyeliminowane z badań ze względu na ich dobrostan, należy poddać pełnemu rozpoznaniu histopatologicznemu. Jeżeli sekcji zwłok nie można przeprowadzić natychmiast po znalezieniu martwego zwierzęcia, zwierzę należy schłodzić (nie zamrozić) do temperatury wystarczająco niskiej do zminimalizowania autolizy. Sekcję zwłok należy przeprowadzić możliwie szybko, zwykle w ciągu jednego lub dwóch dni. W odniesieniu do każdego zwierzęcia należy odnotować wszystkie makroskopowe zmiany patologiczne ze szczególnym uwzględnieniem wszelkich zmian w drogach oddechowych.
33. Można rozważyć przeprowadzenie dodatkowych, uprzednio zaprojektowanych testów w celu zwiększenia wartości interpretacyjnej badania, np. pomiaru masy płuc u szczurów, które przeżyły, czy dostarczenia dowodów na podrażnienie poprzez badanie dróg oddechowych pod mikroskopem. Można również objąć badaniem organy wykazujące wyraźne zmiany patologiczne u zwierząt, które przeżyły 24 lub więcej godzin, oraz organy, co do których wiadomo lub można oczekiwać, że narażenie miało na nie wpływ. Z mikroskopowego badania całych dróg oddechowych można uzyskać użyteczne informacje na temat badanych substancji chemicznych, które reagują z wodą, takich jak kwasy i badane substancje chemiczne o właściwościach higroskopijnych.

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Dane

34. Należy podać dane dotyczące masy ciała i wyników sekcji zwłok dotyczące poszczególnych zwierząt. Dane z obserwacji klinicznych należy zestawić w postaci tabeli, przedstawiając w odniesieniu do każdej badanej grupy liczbę wykorzystanych zwierząt, liczbę zwierząt wykazujących specyficzne oznaki toksyczności, liczbę zwierząt padłych w trakcie trwania badania lub uśmierconych z przyczyn humanitarnych, czas zgonu poszczególnych zwierząt, opis skutków toksycznych oraz ich przebieg w czasie i odwracalność, a także wyniki sekcji zwłok.

Sprawozdanie z badania

35. Sprawozdanie z badania powinno w stosownych przypadkach zawierać następujące informacje:

Badane zwierzęta i ich hodowla

- opis warunków przetrzymywania w klatkach, w tym: liczba (lub zmiana liczby) zwierząt na klatkę, ściółka, temperatura otoczenia i wilgotność względna, fotoperiod i określenie diety,
- wykorzystany gatunek/szczep oraz uzasadnienie zastosowania gatunków innych niż szczur,
- liczba, wiek i płeć zwierząt,
- metoda randomizacji,
- szczegółowe informacje na temat jakości pożywienia i wody (w tym rodzaj/źródło diety oraz źródło wody),
- opis wszelkich przygotowań przed badaniem, w tym diety, kwarantanny i leczenia chorób.

Badana substancja chemiczna

- cechy fizyczne, czystość oraz w stosownych przypadkach właściwości fizykochemiczne (w tym izomeryzacja),
- dane identyfikacyjne i numer w rejestrze Chemical Abstract Services (CAS), jeżeli jest znany.

Nośnik

- uzasadnienie zastosowania nośnika oraz uzasadnienie wyboru nośnika (jeżeli jest inny niż woda),
- dane historyczne lub równoległe wykazujące, że nośnik nie zakłóca wyniku badania.

Komora inhalacyjna

- szczegółowy opis komory inhalacyjnej, w tym jej rozmiary i objętość,
- źródło i opis wyposażenia wykorzystywanego do celów narażenia zwierząt, jak również do wytwarzania atmosfery,
- wyposażenie do pomiaru temperatury, wilgotności, wielkości cząstek i stężenia rzeczywistego,
- źródło powietrza, metoda oczyszczania dostarczanego/pobieranego powietrza oraz system klimatyzacji,
- metody kalibracji wyposażenia w celu zapewnienia jednorodnej atmosfery na potrzeby badania,
- różnica ciśnienia (dodatnia lub ujemna),
- porty narażenia w komorze (narażenie tylko przez nos); lokalizacja zwierząt w układzie (narażenie całego ciała),
- jednorodność/stabilność w czasie atmosfery na potrzeby badania,
- lokalizacja czujników temperatury i wilgotności oraz pobieranie próbek powietrza w komorze,
- natężenie przepływu powietrza, natężenie przepływu powietrza/port narażenia (narażenie tylko przez nos) lub ładunek zwierząt/komorę (narażenie całego ciała),
- informacje na temat wyposażenia stosowanego do pomiaru zawartości tlenu i dwutlenku węgla, w stosownych przypadkach,
- czas potrzebny do wyrównania stężeń w komorze inhalacyjnej (t_{95}),
- liczba zmian objętości na godzinę,
- urządzenia pomiarowe (w stosownych przypadkach).

Dane ekspozycji

- uzasadnienie wyboru docelowego stężenia w badaniu głównym,
- stężenia nominalne (całkowita masa badanej substancji chemicznej wprowadzonej do komory inhalacyjnej podzielona przez objętość powietrza przepuszczonego przez komorę),
- rzeczywiste stężenia badanej substancji chemicznej w próbkach ze strefy oddychania zwierząt; w przypadku mieszanin, które tworzą heterogeniczne formy fizyczne (gazy, pary, aerozole), każdą substancję można analizować oddzielnie,
- wszystkie stężenia substancji w powietrzu należy podawać w jednostkach masy (np. mg/l, mg/m³ itp.), w nawiasie można podać również jednostki objętości (np. ppm, ppb itp.),
- rozkład wielkości cząstek, średnica aerodynamiczna mediany rozkładu masowego (MMAD) oraz geometryczne odchylenie standardowe (σ_g), w tym metody ich obliczania. Należy odnotować poszczególne analizy wielkości cząstek.

Warunki badania

- szczegółowe informacje na temat przygotowania badanej substancji chemicznej, w tym szczegóły dotyczące wszelkich procedur zastosowanych w celu zmniejszenia rozmiaru cząstek substancji stałych lub przygotowania roztworów badanej substancji chemicznej. W przypadkach gdy procesy mechaniczne mogły wpłynąć na zmianę składu badanej substancji chemicznej, należy zamieścić wyniki analiz mających na celu weryfikację składu badanej substancji chemicznej,
- opis (najlepiej wraz ze schematem) wyposażenia wykorzystywanego do wytworzenia atmosfery na potrzeby badania i narażania zwierząt na jej działanie,
- szczegółowe informacje na temat zastosowanej metody analizy chemicznej oraz walidacji metody (w tym wydajność odzysku badanej substancji chemicznej ze środka do pobierania próbek),
- uzasadnienie wyboru badanych stężeń.

Wyniki

- tabelaryczne zestawienie temperatury, wilgotności i przepływu powietrza w komorze,
- tabelaryczne zestawienie danych dotyczących nominalnego i rzeczywistego stężenia w komorze,
- tabelaryczne zestawienie danych dotyczących wielkości cząstek, w tym danych dotyczących gromadzenia próbek analitycznych, zróżnicowania wielkości cząstek oraz obliczenia średnicy aerodynamicznej mediany rozkładu masowego (MMAD) i σ_g ,
- tabelaryczne zestawienie danych dotyczących reakcji i poziomu stężenia dla każdego zwierzęcia (tj. zwierząt wykazujących oznaki toksyczności, w tym śmiertelność, rodzaj, ostrość, czas pojawienia się i czas trwania objawów),
- masy ciała poszczególnych zwierząt zarejestrowane w trakcie badania, data i godzina zgonu, jeśli nastąpił przed planową eutanazją; przebieg w czasie oznak toksyczności i informacje, czy były one odwracalne w przypadku każdego zwierzęcia,
- wyniki sekcji zwłok oraz badań histopatologicznych w odniesieniu do każdego zwierzęcia, jeżeli są dostępne,
- klasyfikacja kategorii według rozporządzenia CLP oraz wartość graniczna LC₅₀.

Omówienie i interpretacja wyników

- szczególny nacisk należy położyć na opis metod zastosowanych w celu spełnienia kryteriów niniejszej metody badawczej, np. dotyczących stężenia granicznego lub rozmiaru cząstek,
- należy uwzględnić respirabilność cząstek w świetle wyników ogólnych, szczególnie jeżeli nie można było spełnić kryterium wielkości cząstek,
- w ogólnej ocenie badania należy uwzględnić spójność metod zastosowanych w celu określenia nominalnego i rzeczywistego stężenia oraz relacji między stężeniem rzeczywistym a nominalnym,
- należy uwzględnić prawdopodobną przyczynę zgonu i dominujący sposób działania (ogólnoustrojowy w porównaniu z miejscowym),
- należy przedstawić wyjaśnienie, jeżeli zaistniała konieczność humanitarnego uśmiercenia zwierząt wykazujących oznaki bólu lub objawy ostrego i przewlekłego stresu, zgodnie z kryteriami zawartymi w wytycznych OECD dotyczących humanitarnego punktu końcowego (7).

BIBLIOGRAFIA:

- (1) Rozdział B.2 niniejszego załącznika. Toksyczność ostra (inhalacyjna).
- (2) Holzhütter H-G, Genschow E, Diener W i Schlede E (2003). Dermal and Inhalation Acute Toxicity Class Methods: Test Procedures and Biometric Evaluations for the Globally Harmonized Classification System. Arch. Toxicol. 77: 243–254.
- (3) Diener W, Kayser D i Schlede E (1997). The Inhalation Acute-Toxic-Class Method; Test Procedures and Biometric Evaluations. Arch. Toxicol. 71: 537–549.

- (4) Diener W i Schlede E (1999). Acute Toxic Class Methods: Alternatives to LD/LC₅₀ Tests. ALTEX 1: 129–134.
 - (5) Rozdział B.1 tris niniejszego załącznika. Ostra toksyczność doustna – metoda klas ostrej toksyczności.
 - (6) OECD (2009). Report on Biostatistical Performance Assessment of the Draft TG 436 Acute Toxic Class Testing Method for Acute Inhalation Toxicity. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment nr 105, OECD, Paryż. Tekst dostępny pod adresem: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
 - (7) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment nr 19. Tekst dostępny pod adresem: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
 - (8) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment nr 39, OECD, Paryż. Tekst dostępny pod adresem: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
 - (9) Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1272/2008 z dnia 16 grudnia 2008 r. w sprawie klasyfikacji, oznakowania i pakowania substancji i mieszanin, zmieniające i uchylające dyrektywy 67/548/EWG i 1999/45/WE oraz zmieniające rozporządzenie (WE) nr 1907/2006 (Dz.U. L 353 z 31.12.2008, s. 1).
 - (10) Rozdział B.40 niniejszego załącznika. Badanie niszczenia skóry metodą *in vitro*: test przeskórnego oporu elektrycznego (TER).
 - (11) Rozdział B.40 bis niniejszego załącznika. Badanie zniszczenia skóry metodą *in vitro*: badanie modelu skóry ludzkiej.
 - (12) OECD (2005). In Vitro Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion. OECD Guideline for testing of chemicals nr 435, OECD, Paryż. Tekst dostępny pod adresem: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
 - (13) Phalen RF (2009). Inhalation Studies: Foundations and Techniques. (2 wydanie) Informa Healthcare, Nowy Jork.
 - (14) SOT (1992). Technical Committee of the Inhalation Specialty Section, Society of Toxicology (SOT). Recommendations for the Conduct of Acute Inhalation Limit Tests. Fund. Appl. Toxicol. 18: 321–327.
 - (15) Pauluhn J i Thiel A (2007). A Simple Approach to Validation of Directed-Flow Nose-Only Inhalation Chambers. J. Appl. Toxicol. 27: 160–167
 - (16) ONZ (2007), Globalnie Zharmonizowany System Klasyfikacji i Oznakowania Chemikaliów (GHS) ONZ, ST/SG/AC.10/30, ONZ Nowy Jork i Genewa. Tekst dostępny pod adresem: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_welcome_e.html]
-

Dodatek 1

DEFINICJA

Badana substancja chemiczna: jakakolwiek substancja lub mieszanina badana za pomocą niniejszej metody badawczej.

Dodatek 2

Procedura, jaką należy zastosować przy każdym z wyjściowych stężeń w przypadku gazów (ppm/4h)Uwagi ogólne ⁽¹⁾

Dla każdego stężenia wyjściowego odpowiednie plany badań zawarte w niniejszym dodatku przedstawiają procedurę, jaką należy zastosować.

Dodatek 2a: Stężenie wyjściowe wynosi 100 ppm

Dodatek 2b: Stężenie wyjściowe wynosi 500 ppm

Dodatek 2c: Stężenie wyjściowe wynosi 2 500 ppm

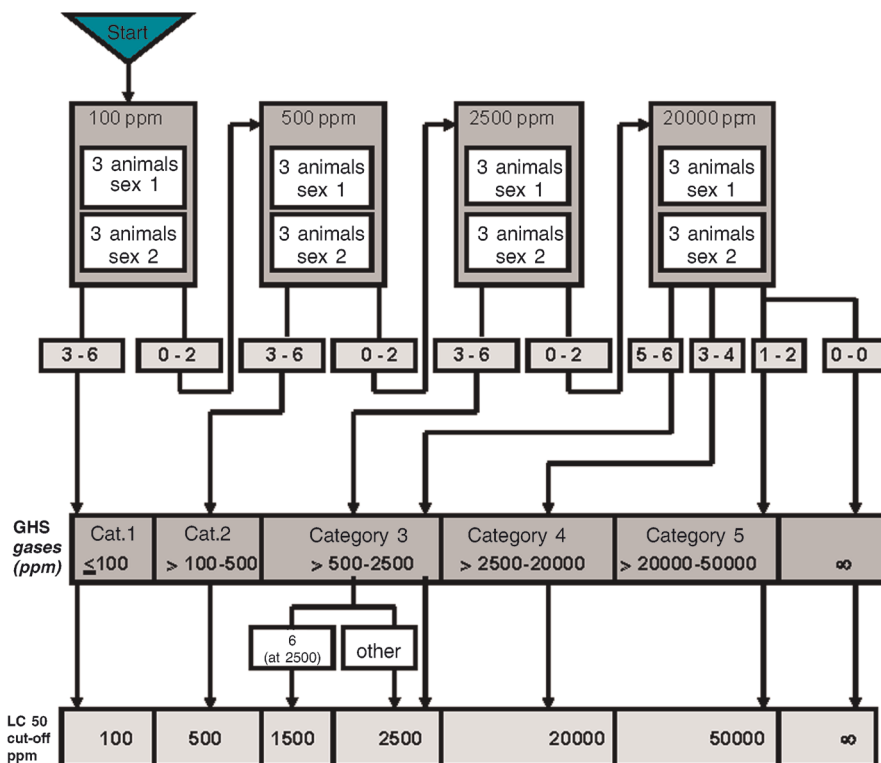
Dodatek 2d: Stężenie wyjściowe wynosi 20 000 ppm

W zależności od liczby zwierząt uśmierconych z powodów humanitarnych lub zwierząt padłych procedurę badania przeprowadza się zgodnie ze wskazanymi strzałkami.

⁽¹⁾ Poniższe tabele odnoszą się do Globalnie Zharmonizowanego Systemu Klasyfikacji i Oznakowania Chemikaliów (GHS). Jego odpowiednikiem na poziomie UE jest rozporządzenie (WE) nr 1272/2008. W przypadku ostrej toksyczności inhalacyjnej rozporządzenie (WE) nr 1272/2008 (9) nie wdraża kategorii 5.

Dodatek 2a

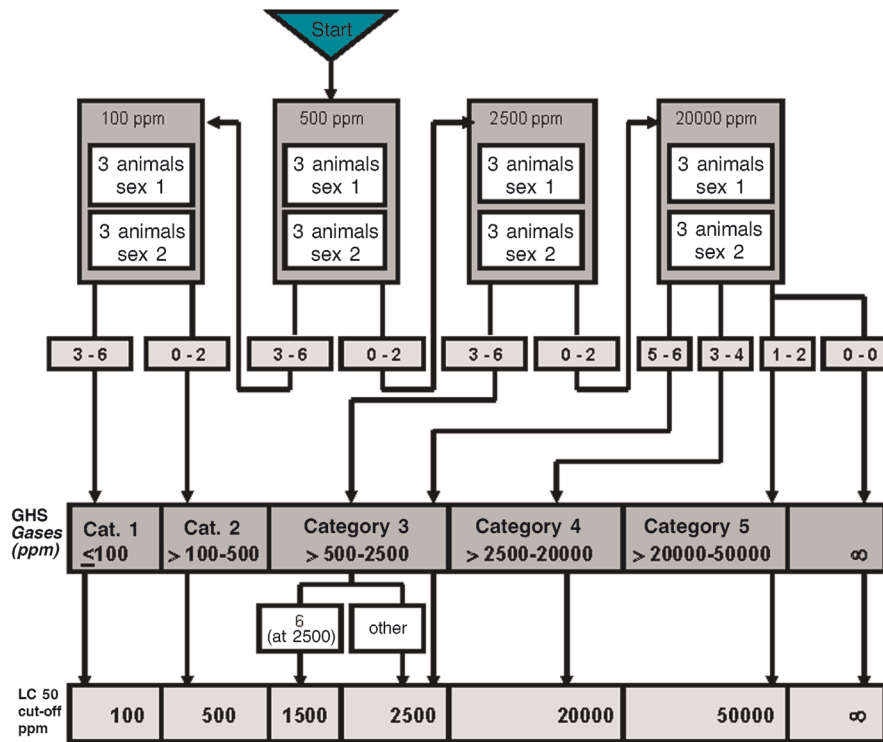
**Acute Inhalation Toxicity:
Test Procedure with a starting concentration of 100 ppm/4 h for gases**



- 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step
- 0-6: Number of moribund or dead animals/tested concentraion
- GHS: Globally Harmonized Classification System
- ∞: unclassified
- Testing at ≥ 20000 ppm/4h: see Guidance Document 39 (8)

Dodatek 2b

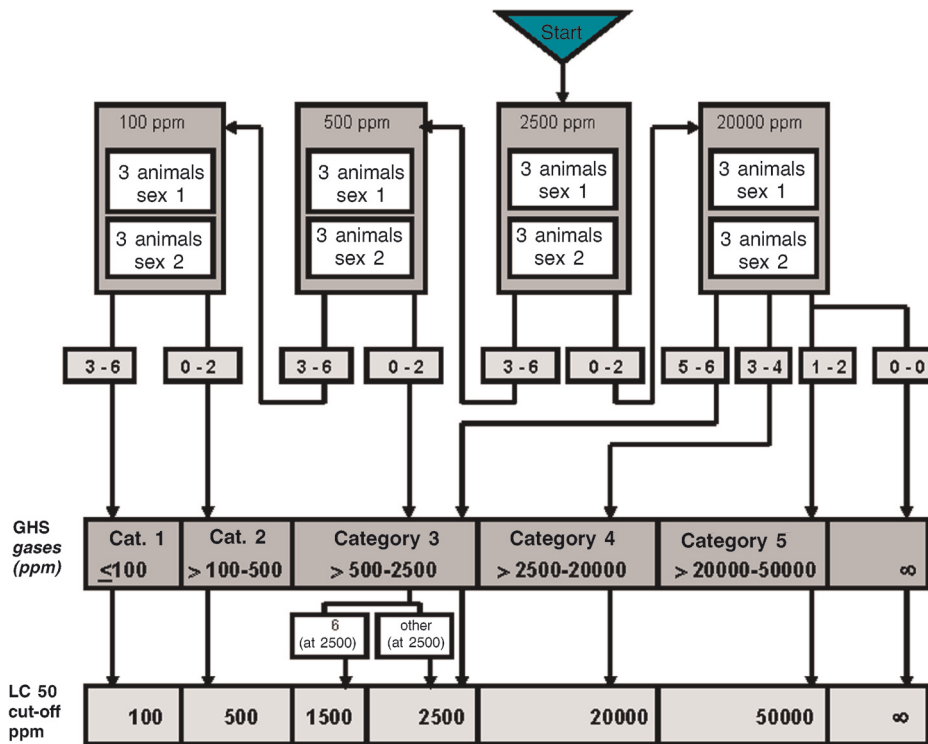
**Acute Inhalation Toxicity:
Test Procedure with a starting concentration of 500 ppm/4h for gases**



- 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step
- 0-6: Number of moribund or dead animals/tested concentration
- GHS: Globally Harmonized Classification System
- ∞: unclassified
- Testing at ≥ 20000 ppm/4h: see Guidance Document 39 (8)

Dodatek 2c

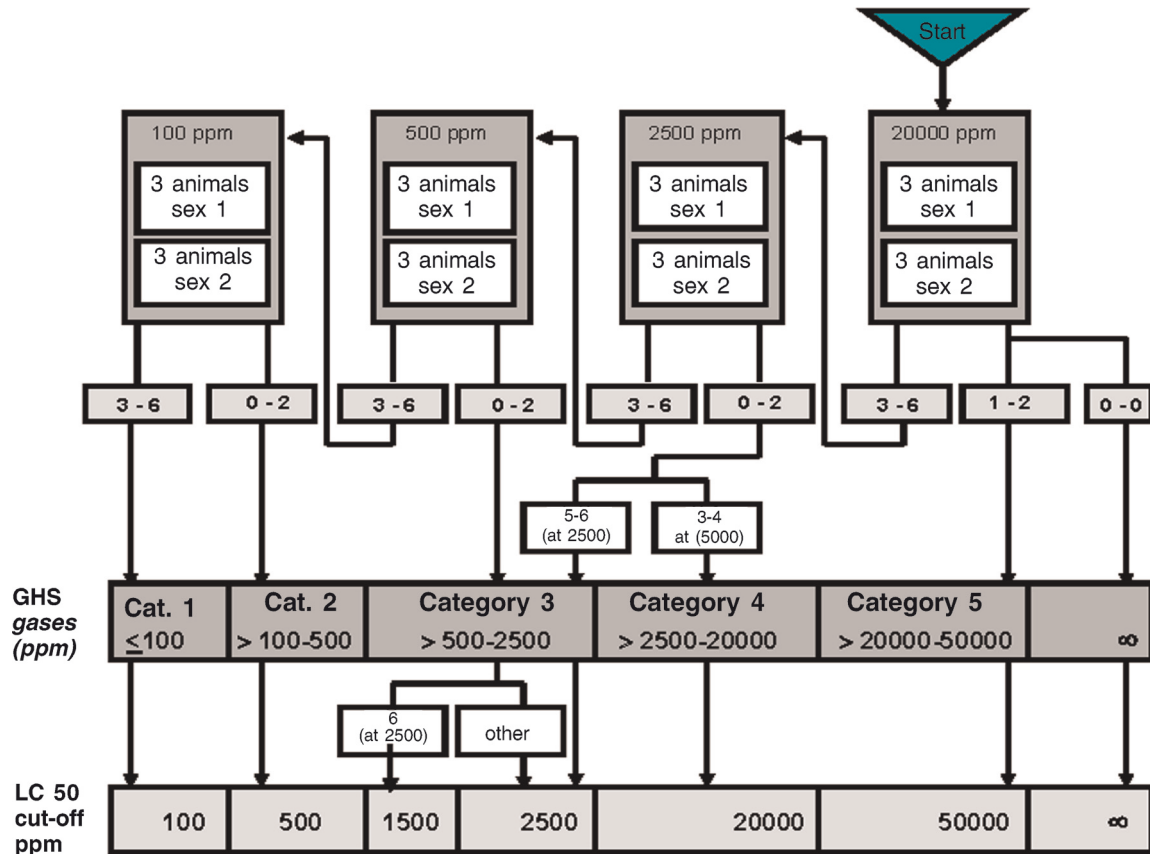
**Acute Inhalation Toxicity:
Test Procedure with a starting concentration of 2 500 ppm/4h for gases**



- 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step
- 0-6: Number of moribund or dead animals/tested concentration
- GHS: Globally Harmonized Classification System
- ∞: unclassified
- Testing at ≥ 20000 ppm/4h: see Guidance Document 39 (8)

Dodatek 2d

Acute Inhalation Toxicity:
Test Procedure with a starting concentration of 20 000 ppm/4h for gases



- 3 σ + 3 φ , or 6 animals of the more susceptible sex are used per step
- 0-6: Number of moribund or dead animals/tested concentration
- GHS: Globally Harmonized Classification System
- ∞ : unclassified
- Testing at ≥ 20000 ppm/4h: see Guidance Document 39 (8)

Dodatek 3

Procedura, jaką należy zastosować przy każdym z wyjściowych stężeń w przypadku par (mg/l/4h)Uwagi ogólne ⁽¹⁾

Dla każdego stężenia wyjściowego odpowiednie plany badań zawarte w niniejszym dodatku przedstawiają procedurę, jaką należy zastosować.

Dodatek 3a: Stężenie wyjściowe wynosi 0,5 mg/l

Dodatek 3b: Stężenie wyjściowe wynosi 2,0 mg/l

Dodatek 3c: Stężenie wyjściowe wynosi 10 mg/l

Dodatek 3d: Stężenie wyjściowe wynosi 20 mg/l

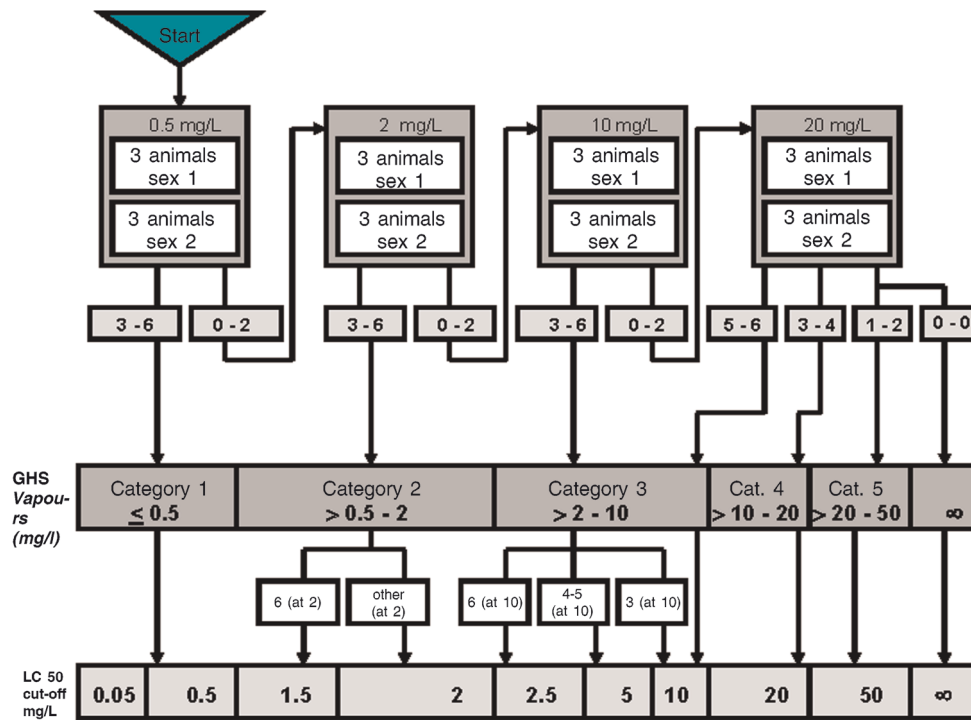
W zależności od liczby zwierząt uśmierconych z powodów humanitarnych lub zwierząt padłych procedurę badania przeprowadza się zgodnie ze wskazanymi strzałkami.

⁽¹⁾ Poniższe tabele odnoszą się do Globalnie Zharmonizowanego Systemu Klasyfikacji i Oznakowania Chemikaliów (GHS). Jego odpowiednikiem na poziomie UE jest rozporządzenie (WE) nr 1272/2008. W przypadku ostrej toksyczności inhalacyjnej rozporządzenie (WE) nr 1272/2008 (9) nie wdraża kategorii 5.

Dodatek 3a

Acute Inhalation Toxicity:

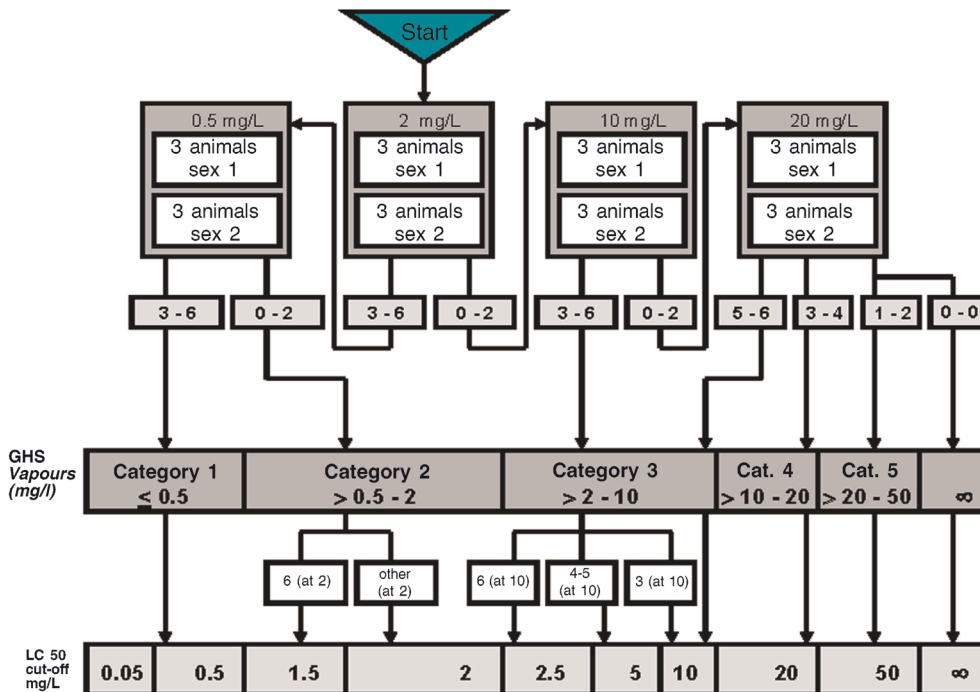
Test procedure with a starting concentration of 0.5 mg/L/4h for vapours



- 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step
- 0-6: Number of moribund or dead animals/tested concentration
- GHS: Globally Harmonized Classification System
- ∞ : unclassified
- Testing at 50 mg/L/4h: see Guidance Document 39 (8)

Dodatek 3b

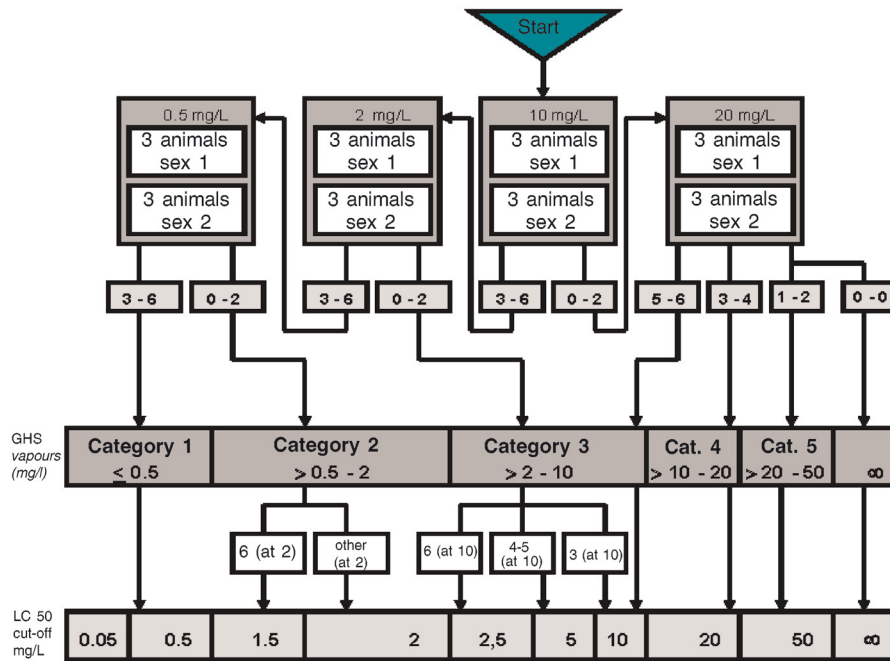
Acute Inhalation Toxicity:
Test procedure with a starting concentration of 2 mg/L/4h for vapours



- 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step
- 0-6: Number of moribund or dead animals/tested concentraion
- GHS: Globally Harmonized Classification System
- ∞: unclassified
- Testing at 50 mg/L4h: see Guidance Document 39 (8)

Dodatek 3c

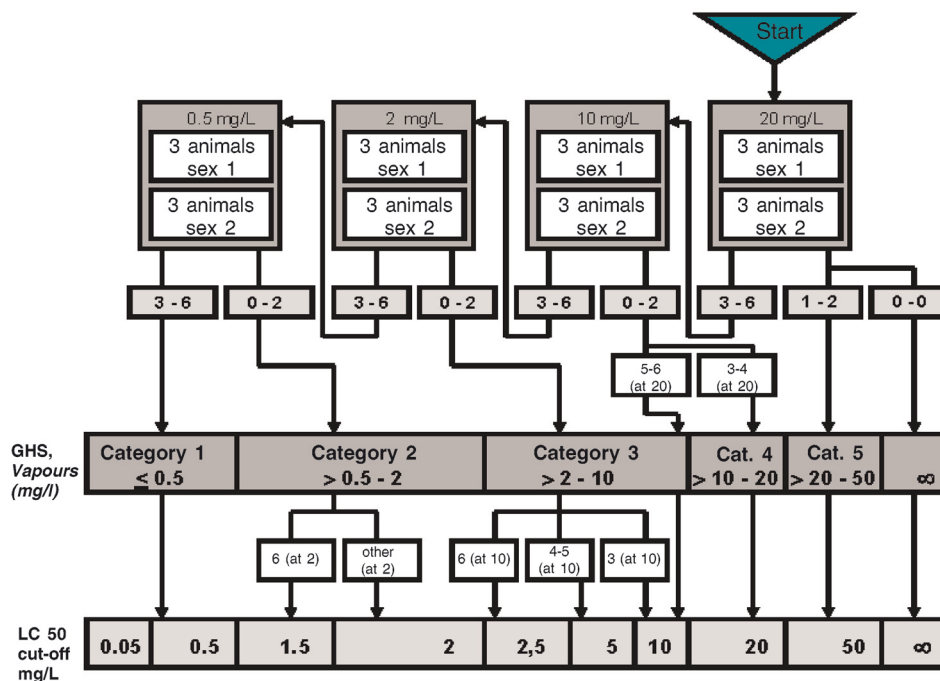
Acute Inhalation Toxicity:
Test procedure with a starting concentration of 10 mg/L/4h for vapours



- 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used pers step
- 0-6: Number of moribund or dead animals/tested concentraion
- GHS: Globally Harmonized Classification System
- ∞: unclassified
- Testing at 50 mg/L/4h: see Guidance Document 39 (8)

Dodatek 3d

Acute Inhalation Toxicity:
Test procedure with a starting concentration of 20 mg/L/4h for vapours



- 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step
- 0-6: Number of moribund or dead animals/tested concentration
- GHS: Globally Harmonized Classification System
- ∞: unclassified
- Testing at 50 mg/L/4h: see Guidance Document 39(8)

Dodatek 4

Procedura, jaką należy zastosować przy każdym z wyjściowych stężeń w przypadku aerozoli (mg/l/4h)Uwagi ogólne ⁽¹⁾

Dla każdego stężenia wyjściowego odpowiednie plany badań zawarte w niniejszym dodatku przedstawiają procedurę, jaką należy zastosować.

Dodatek 4a: Stężenie wyjściowe wynosi 0,05 mg/l

Dodatek 4b: Stężenie wyjściowe wynosi 0,5 mg/l

Dodatek 4c: Stężenie wyjściowe wynosi 1 mg/l

Dodatek 4d: Stężenie wyjściowe wynosi 5 mg/l

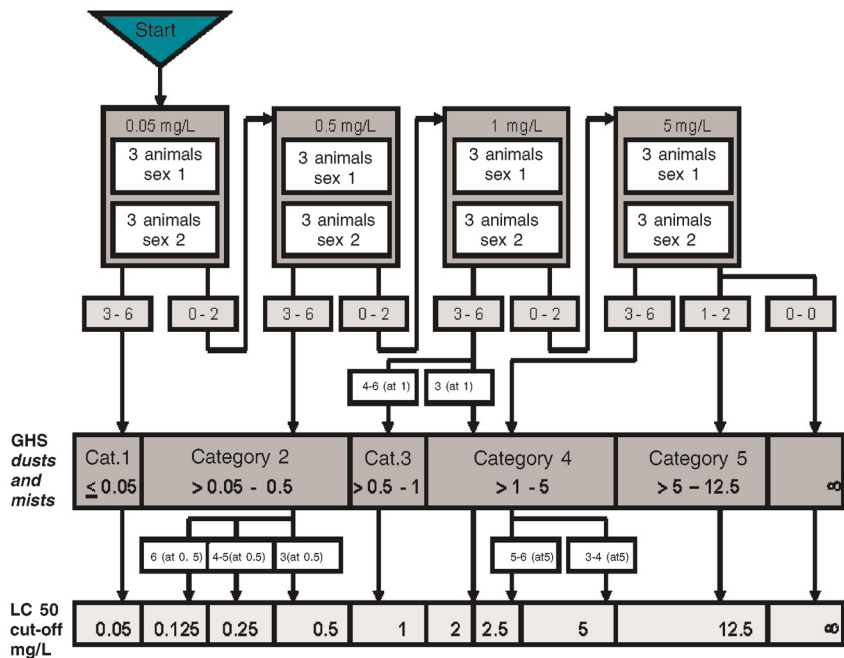
W zależności od liczby zwierząt uśmierconych w sposób humanitarny lub martwych zwierząt procedura badań przebiega zgodnie z kierunkiem wyznaczonym przez strzałki.

⁽¹⁾ Poniższe tabele odnoszą się do Globalnie Zharmonizowanego Systemu Klasyfikacji i Oznakowania Chemikaliów (GHS). Jego odpowiednikiem na poziomie UE jest rozporządzenie (WE) nr 1272/2008. W przypadku ostrej toksyczności inhalacyjnej rozporządzenie (WE) nr 1272/2008 (9) nie wdraża kategorii 5.

Dodatek 4a

Acute Inhalation Toxicity:

Test procedure with a starting concentration of 0.05 mg/L/4h for vapours

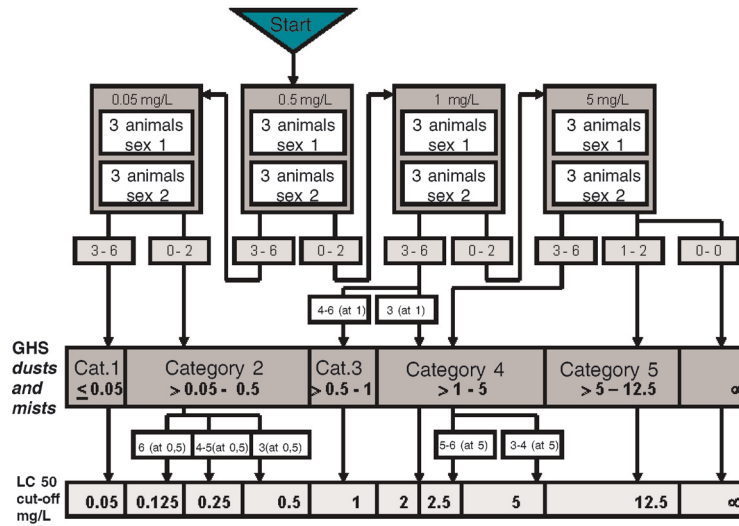


- 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step
- 0-6: Number of moribund or dead animals/tested concentraion
- GHS: Globally Harmonized Classification System
- ∞: unclassified
- Testing at 12.5 mg/L4h: see Guidance Document 39 (8)

Dodatek 4b

Acute Inhalation Toxicity:

Test procedure with a starting concentration of 0.5 mg/L/4h for aerosols

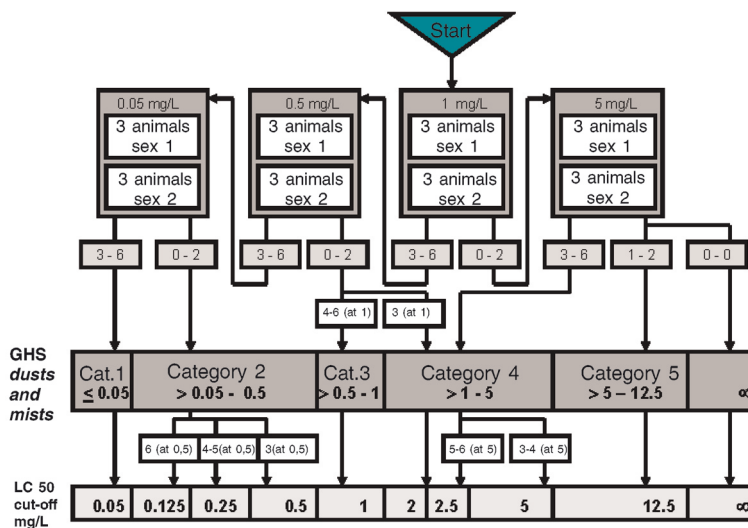


- 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step
- 0-6: Number of moribund or dead animals/tested concentration
- GHS: Globally Harmonized Classification System
- ∞: unclassified
- Testing at 12.5 mg/L/4h: see Guidance Document 39 (8)

Dodatek 4c

Acute inhalation toxicity:

Test procedure with a starting concentration of 1 mg/L/4h for aerosols

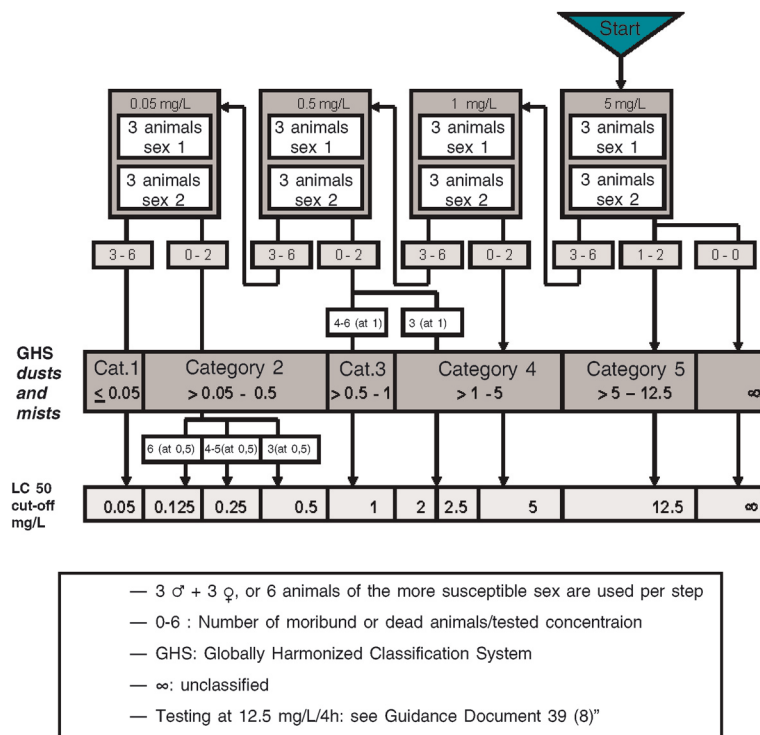


- 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step
- 0-6: Number of moribund or dead animals/tested concentraion
- GHS: Globally Harmonized Classification System
- ∞: unclassified
- Testing at 12.5 mg/L/4h: see Guidance Document 39 (8)

Dodatek 3d

Acute Inhalation Toxicity:

Test procedure with a starting concentration of 20 mg/L/4h for vapours



9) rozdział C.10 otrzymuje brzmienie:

„C.10. SYMULACYJNE BADANIE W WARUNKACH TLENOWYCH W OCZYSZCZALNIACH ŚCIEKÓW:
C.10-A: ZESTAWY OSADU CZYNNEGO - C.10-B: BIOFILMY

C.10-A: Zestawy osadu czynnego

WPROWADZENIE

1. Niniejsza metoda badawcza jest równoważna metodzie opisanej w dotyczącej badań wytycznej OECD nr 303 (2001). W latach 50. XX w. zdano sobie sprawę, że nowo wprowadzane środki powierzchniowo czynne powodują nadmierne pienienie w oczyszczalniach ścieków i w rzekach. Nie były w pełni usuwane w drodze rozkładu tlenowego i w niektórych przypadkach ograniczały usuwanie substancji organicznych. To spowodowało podjęcie wielu badań na temat tego, jak środki powierzchniowo czynne mogłyby być usuwane ze ścieków i czy nowe substancje chemiczne wytwarzane w produkcji przemysłowej poddają się oczyszczaniu. W tym celu wykorzystano zestawy modelowe odpowiadające dwóm głównym typom tlenowego oczyszczania biologicznego ścieków (zestaw osadu czynnego i zestaw ze złożem zraszanym). Niepraktycznym i bardzo kosztownym rozwiązaniem byłaby dystrybucja każdej nowej substancji chemicznej i monitorowanie dużych oczyszczalni ścieków, nawet w kontekście lokalnym.

WSTĘPNE ROZWAŻANIA

Zestawy osadu czynnego

2. Opisano modelowe zestawy osadu czynnego w zakresie wielkości od 300 ml do ok. 2 000 ml. Niektóre były bardzo podobne do instalacji normalnej wielkości i zawierały osadniki, z których osad przepompowywany był z powrotem do zbiornika napowietrzającego, podczas gdy inne nie obejmowały osadników, np. Swisher (1). Rozmiar przyrządu jest efektem kompromisu: z jednej strony musi on być wystarczająco duży, by możliwe było przeprowadzenie z powodzeniem działań mechanicznych oraz zapewnienie wystarczającej objętości próbek bez wpływu na całość procedur, z drugiej strony zaś nie może wymagać nadmiernej przestrzeni i ilości materiałów.

3. Dwa przyrządy stosowane powszechnie i z powodzeniem to zestawy Husmanna (2) i zestawy naczyń porowatych (3) (4), używane początkowo przy badaniu środków powierzchniowo czynnych; opisano je w niniejszej metodzie badawczej. Z powodzeniem używano również innych przyrządów, np. Eckenfeldera (5). Z powodu dość wysokiego kosztu i wysiłków związanych ze stosowaniem tego badania symulacyjnego jednocześnie poddano analizie prostsze i tańsze badania przesiewowe, zawarte obecnie w rozdziale C.4 A-F niniejszego załącznika (6). Doświadczenia z wieloma środkami powierzchniowo czynnymi oraz innymi substancjami chemicznymi pokazały, że te, które przeszły z powodzeniem badania przesiewowe (szybko biodegradowalne), ulegały również degradacji w badaniu symulacyjnym. Niektóre substancje, które nie przeszły z powodzeniem badań przesiewowych, przeszły badania naturalnej biodegradowalności (rozdziały C.12 (7) oraz C.19 (8) niniejszego załącznika), jednak tylko niektóre z tej ostatniej grupy uległy degradacji w badaniu symulacyjnym, podczas gdy te substancje, które nie przeszły z powodzeniem badania naturalnej podatności na biodegradację, nie uległy degradacji w badaniach symulacyjnych (9) (10) (11).
4. Badania przeprowadzane przy jednym układzie warunków działania są wystarczające do niektórych celów; wyniki wyraża się jako wartość procentową usunięcia badanej substancji chemicznej lub rozpuszczonego węgla organicznego (DOC). Opis takiego badania podany jest w niniejszej metodzie badawczej. Jednakże w przeciwieństwie do wcześniejszej wersji niniejszego rozdziału, w której opisano tylko jeden typ przyrządu do oczyszczania ścieków syntetycznych w trybie połączonym przy zastosowaniu względnie prostej metody degradacji osadu, w niniejszym tekście przedstawiono szereg możliwości. Opisano alternatywy dla typu przyrządu, trybu działania oraz usuwania ścieków i osadu po degradacji. Niniejszy tekst ściśle odpowiada tekstowi ISO 11733 (12), który został dokładnie przeanalizowany w trakcie przygotowań, choć metody nie poddano badaniu międzylaboratoryjnemu.
5. Dla innych celów konieczna jest dokładniejsza znajomość stężenia badanej substancji chemicznej w odpływie, a do tego potrzebny jest model bardziej ekstensywny. Przykładowo, współczynnik degradacji osadu musi być dokładniej kontrolowany przez cały dzień oraz w ciągu całego czasu badania i konieczne jest przeprowadzenie badań na zestawach przy szeregu różnych współczynników degradacji. W przypadku najbardziej szczegółowej metody badania należy również przeprowadzić w dwóch lub trzech różnych temperaturach: metoda taka została opisana przez Bircha (13) (14) i streszczona w dodatku 6. Jednakże obecna wiedza nie wystarcza do stwierdzenia, który model kinetyczny ma zastosowanie do biodegradacji substancji chemicznych w oczyszczaniu ścieków i ogólnie w środowisku wodnym. Zastosowanie kinetyki Monoda, podane w dodatku 6 jako przykład, jest ograniczone do substancji chemicznych obecnych w ilości co najmniej 1 mg/l, ale w opinii niektórych badaczy nawet to musi zostać uzasadnione. Badania przy stężeniach bardziej dokładnie odzwierciedlających stężenia występujące w ściekach zostały wskazane w dodatku 7, ale takie badania, podobnie jak te zawarte w dodatku 6, przedstawione są w dodatkach, a nie jako osobne metody badawcze.

Filtry

6. Dużo mniej uwagi poświęcono modelom złożu zraszanych, być może dlatego, że są bardziej niewygodne i większe niż instalacje z osadem czynnym. Gerike i in. stworzyli zestawy złożu zraszanych i przeprowadzili na nich działania w trybie połączonym (15). Filtry te były dość duże (wysokość 2 m, pojemność 60 l) i do każdego z nich potrzeba było aż 2 l/h ścieków. Baumann i in. (16) stworzyli symulację złożu zraszanych wkładając paski z «wełny» poliestrowej do 1-metrowych rur (o średnicy wewnętrznej 14 mm) po wcześniejszym zanurzeniu pasków przez 30 min. w stężonym osadzie czynnym. Badana substancja chemiczna jako jedyne źródło C w roztworze soli mineralnych była przepuszczana przez pionową rurę, po czym oceniano biodegradację w oparciu o pomiary DOC w odpływie i CO₂ w powstającym gazie.
7. Biofiltry symulowano w inny sposób (15); na wewnętrzne powierzchnie obracających się rur nachylonych pod niewielkim kątem w stosunku do poziomu podawano ścieki (ok. 250 ml/h) zawierające badaną substancję chemiczną i pozbawione jej, a zgromadzony odpływ analizowano pod kątem zawartości DOC lub właściwej badanej substancji chemicznej.

ZASADA BADANIA

8. Celem niniejszej metody jest określenie eliminacji oraz pierwotnej lub ostatecznej biodegradacji rozpuszczalnych w wodzie organicznych substancji chemicznych przez mikroorganizmy tlenowe w stale działającym systemie badawczym symulującym proces osadu czynnego. Ulegająca łatwej biodegradacji pożywka organiczna oraz badana organiczna substancja chemiczna są źródłami węgla i energii dla mikroorganizmów.
9. Dwa stale działające zestawy badawcze (instalacje z osadem czynnym lub naczynia porowate) pracują jednocześnie w identycznych warunkach, które odpowiadają celowi badania. Średni hydrauliczny czas retencji wynosi normalnie 6 h, a średni wiek osadu (czas retencji osadu) od 6 do 10 dni. Osad oczyszczany jest przy wykorzystaniu jednej z dwóch metod, badana substancja chemiczna jest normalnie dodawana w stężeniu pomiędzy 10 mg/l rozpuszczonego węgla organicznego (DOC) a 20 mg/l DOC do wcieku (pożywki organicznej) tylko w jednym zestawie. Drugi zestaw wykorzystywany jest jako zestaw kontrolny do określenia biodegradacji pożywki organicznej.
10. W często pobieranych próbkach odpływów określa się poziom DOC – co jest lepszym rozwiązaniem – lub poziom chemicznego zapotrzebowania na tlen (ChZT) oraz stężenie badanej substancji chemicznej (o ile jest to konieczne) w odpływie z zestawu pobierającego badaną substancję chemiczną przy wykorzystaniu analizy właściwej. Przyjmuje się, że różnice pomiędzy stężeniami DOC lub ChZT w zestawie badawczym i zestawie kontrolnym wynikają z działania badanej substancji chemicznej lub jej organicznych metabolitów. Różnicę tę porównuje się z powstałym we wcieku wskutek dodania badanej substancji chemicznej stężeniem DOC lub ChZT w celu określenia eliminacji badanej substancji chemicznej.

11. Biodegradację można na ogół odróżnić od bioadsorpcji dzięki dokładnemu zbadaniu krzywej czasu eliminacji, a wynik można zazwyczaj potwierdzić, stosując badanie szybkiej biodegradacji przy wykorzystaniu aklimatyzowanego inokulum z zestawu, do którego dodaje się badaną substancję chemiczną.

INFORMACJE NA TEMAT BADANEJ SUBSTANCJI CHEMICZNEJ

12. Właściwości badanej substancji chemicznej związane z czystością, rozpuszczalnością w wodzie, lotnością i adsorpcją powinny być znane, tak aby możliwa była prawidłowa interpretacja wyników. Na ogół nie jest możliwe badanie lotnych ani nierozpuszczalnych substancji chemicznych, chyba że podjęte zostaną specjalne środki (zob. dodatek 5). Należy również znać strukturę chemiczną, a przynajmniej wzór empiryczny, tak aby można było obliczyć wartości teoretyczne lub sprawdzić zmierzone wartości parametrów, np. teoretyczne zapotrzebowanie na tlen (TZT), rozpuszczony węgiel organiczny (DOC) oraz chemiczne zapotrzebowanie na tlen (ChZT).
13. Informacje na temat toksyczności badanej substancji chemicznej dla mikroorganizmów (zob. dodatek 4) mogą być bardzo użyteczne przy wyborze odpowiednich stężeń do badania i mogą być niezbędne dla prawidłowej interpretacji niskich wartości biodegradacji.

POZIOMY PROGOWE

14. W pierwotnym zastosowaniu niniejszego badania symulacyjnego (potwierdzającego) w odniesieniu do pierwotnej biodegradacji środków powierzchniowo czynnych konieczne jest usunięcie ponad 80 % danej substancji chemicznej, aby dany środek mógł zostać wprowadzony do obrotu. Jeśli poziom 80 % nie zostanie osiągnięty, dane badanie symulacyjne (potwierdzające) może zostać zastosowane, a środek powierzchniowo czynny może zostać wprowadzony do obrotu, tylko jeśli ponad 90 % danej substancji chemicznej zostanie usunięte. W przypadku substancji chemicznych zasadniczo nie mówi się o przejściu badania z powodzeniem/bez powodzenia, a uzyskana wartość procentowa usunięcia może zostać wykorzystana w aproksymacji prawdopodobnego stężenia w środowisku, stosowanej przy ocenach zagrożenia chemicznego stwarzanego przez substancje chemiczne. Wyniki układają się zazwyczaj w schemat »wszystko albo nic«. W licznych badaniach czystych substancji chemicznych stwierdzono wartość procentową usunięcia DOC na poziomie > 90 % w ponad trzech czwartych, a > 80 % w ponad 90 % substancji, które wykazywały jakikolwiek znaczący poziom biodegradowalności.
15. Stosunkowo niewiele substancji chemicznych (np. środków powierzchniowo czynnych) obecnych jest w ściekach w stężeniach (ok. 10 mg C/l) wykorzystywanych w niniejszym badaniu. Niektóre substancje chemiczne mogą w tych stężeniach mieć działanie hamujące, podczas gdy kinetyka usuwania innych może być utrudniona przy niskich stężeniach. Bardziej dokładnej oceny degradacji można byłoby dokonać przy wykorzystaniu zmodyfikowanych metod i realistycznie niskich stężeń badanej substancji chemicznej, a zgromadzone dane mogłyby zostać wykorzystane do obliczenia stałych kinetycznych. Jednakże niezbędne techniki eksperymentalne nie zostały jeszcze w pełni zwalidowane, a modele kinetyczne opisujące reakcje biodegradacji nie zostały jeszcze ustanowione (zob. dodatek 7).

SUBSTANCJE ODNIESIENIA

16. Dla zapewnienia prawidłowego przeprowadzenia procedury eksperymentu warto od czasu do czasu, wraz z substancjami badanymi, testować substancje chemiczne, których zachowanie jest znane. Substancje takie to na przykład kwas adypinowy, 2-fenylfenol, 1-naftol, kwas 2,2'-bifenylodikarboksyłowy, kwas 1-naftalenokarboksyłowy itp. (9) (10) (11).

ODTWARZALNOŚĆ WYNIKÓW BADAŃ

17. Istnieje dużo mniej sprawozdań z badań symulacyjnych niż z badań szybkiej biodegradowalności. Odtwarzalność pomiędzy (równoczesnymi) powtórzeniami jest na wysokim poziomie (w zakresie 10–15 %) w przypadku substancji chemicznych zdegradowanych o 80 % lub więcej, ale w przypadku słabiej zdegradowanych substancji chemicznych występuje większe zróżnicowanie. Ponadto w przypadku niektórych substancji chemicznych o wartości granicznej odnotowano bardzo zróżnicowane wyniki (np. 10 % i 90 %) przy różnych okazjach w ciągu 9 tygodni dopuszczonych w badaniu.
18. W przypadku wyników otrzymanych przy wykorzystaniu obydwu rodzajów przyrządów różnice były nieznaczące, ale niektóre substancje chemiczne ulegały degradacji w większym zakresie i bardziej dokładnie w przypadku ścieków domowych niż ścieków syntetycznych OECD.

OPIS METODY BADAWCZEJ

Przyrząd

Układ badawczy

19. Układ badawczy dla jednej substancji chemicznej składa się z zestawu badawczego i zestawu kontrolnego; jednak w przypadku przeprowadzania tylko konkretnych analiz (biodegradacja pierwotna) konieczny jest tylko zestaw badawczy. Jeden zestaw kontrolny może być wykorzystywany przy kilku zestawach badawczych z tymi samymi lub różnymi badanymi substancjami chemicznymi. W przypadku połączenia (dodatek 3) każdy zestaw badawczy musi mieć własny zestaw kontrolny. Układem badawczym może być instalacja z osadem czynnym, zestaw Husmanna (dodatek 1, rysunek 1) lub naczynie porowate (dodatek 1, rysunek 2). W obydwu przypadkach konieczne są odpowiedniej wielkości zbiorniki magazynujące na wcieki i odpływy oraz pompy dozujące wciek i roztwór badanej substancji chemicznej, zmieszane lub osobno.

20. Każdy zestaw osadu czynnego składa się z naczynia napowietrzającego o znanej pojemności ok. 3 l osadu czynnego oraz osadnika (osadnika wtórnego) o pojemności ok. 1,5 l; pojemności te można w pewnym zakresie zmieniać korygując wysokość osadnika. Naczynia różnej wielkości są dopuszczalne, jeśli poddawane są porównywalnym obciążeniom hydraulicznym. Jeśli nie jest możliwe utrzymanie temperatury w pomieszczeniu badawczym w planowanym zakresie, zaleca się zastosowanie naczyń z płaszczem wodnym o kontrolowanej temperaturze wody. Do transportu osadu czynnego z osadnika do naczynia napowietrzającego wykorzystuje się podnośnik powietrzny lub pompę dozującą działającą w systemie stałym lub przerywanym w regularnych odstępach czasu.
21. System naczyń porowatych składa się z wewnętrznego porowatego cylindra o stożkowym dnie umieszczonego w nieco większym naczyniu o tym samym kształcie, ale wykonanym z nieprzepuszczalnego tworzywa sztucznego. Odpowiednim materiałem na naczynie porowate jest porowaty polietylen o maksymalnej średnicy porów 90 μm i grubości 2 mm. Oddzielenie osadu od pożywki organicznej następuje wskutek różnicowego przepływu przez porowate ściany. Odpływy gromadzą się w przestrzeni pierścienia, z której przepływają do naczynia magazynującego. Nie następuje sedimentacja, a więc nie ma zwrotu osadu. Cały układ może być zamontowany w kontrolowanej termostatycznie kąpeli wodnej. Na początkowych etapach naczynia porowate mogą ulegać zablokowaniu i powodować przelewanie. W takiej sytuacji należy wymienić zablokowaną wkładkę na czystą, najpierw zlewając osad z naczynia do czystego kubła i usuwając zablokowaną wkładkę. Po wytarciu nieprzepuszczalnego cylindra zewnętrznego należy umieścić w nim czystą wkładkę i ponownie wprowadzić osad do naczynia. Cały osad, który przyłgął do bocznych części zablokowanej wkładki, również należy ostrożnie zdjąć i przenieść. Zablokowane naczynia należy wyczyścić najpierw za pomocą małej dyszy wodnej w celu usunięcia pozostałego osadu, następnie poprzez zanurzenie kolejno w rozcieńczonym roztworze podchlorynu sodu i w wodzie, a na koniec dokładnie spłukać wodą.
22. Do napowietżenia osadu w naczyniach napowietrzających obydwu układów konieczne są odpowiednie techniki, na przykład zastosowanie spiekanych kostek (kamieni napowietrzających) i sprężonego powietrza. Powietrze oczyszcza się w razie potrzeby poprzez przepuszczenie przez odpowiedni filtr i płukanie. Przez układ musi przejść wystarczająca ilość powietrza, tak by możliwe było zachowanie warunków tlenowych i utrzymanie kłaczków osadu w zawieszeniu przez cały czas trwania badania.

Przyrząd do filtrowania lub wirówka

23. Urządzenie do filtrowania próbek z filtrami membranowymi o odpowiedniej porowatości (nominalna średnica otworu 0,45 μm), które adsorbują rozpuszczalne organiczne substancje chemiczne i uwalniają węgiel organiczny w minimalnym stopniu. W przypadku stosowania filtrów uwalniających węgiel organiczny należy zmyć filtry dokładnie gorącą wodą w celu usunięcia wymywalnego węgla organicznego. Alternatywnie można zastosować wirówkę mogącą osiągnąć 40 000 m/s^2 .

Sprzęt do wykonywania analiz

24. Przyrząd konieczny do oznaczenia:

- DOC (rozpuszczonego węgla organicznego) i TOC (całkowitego węgla organicznego) lub ChZT (chemicznego zapotrzebowania na tlen),
- konkretnej substancji chemicznej, o ile jest to konieczne,
- zawiesin, pH, stężenia tlenu w wodzie,
- temperatury, kwasowości i zasadowości,
- amonu, azotynu i azotanu, jeśli badanie przeprowadzane jest w warunkach nityfikacyjnych.

Woda

25. Woda wodociągowa, zawierająca mniej niż 3 mg/l DOC. Należy określić zasadowość, jeśli nie jest jeszcze znana.
26. Woda dejonizowana, zawierająca mniej niż 2 mg/l DOC.

Pożywka organiczna

27. Jako pożywkę organiczną można stosować ścieki syntetyczne, ścieki domowe lub mieszaninę obydwu tych typów. Wykazano (11) (14), że zastosowanie wyłącznie ścieków domowych często skutkuje zwiększoną wartością procentową usunięcia DOC, a nawet umożliwia usunięcie i biodegradację niektórych substancji chemicznych, które nie ulegają biodegradacji w przypadku zastosowania syntetycznych ścieków OECD. Ponadto stałe lub przerywane dodawanie ścieków domowych często stabilizuje osad czynny, w tym jego kluczowy potencjał – dobre osadzanie. Dlatego też zaleca się stosowanie ścieków domowych. Należy zmierzyć stężenie DOC lub ChZT w każdej nowej partii pożywki organicznej. Kwasowość lub zasadowość pożywki organicznej powinna być znana. Pożywka organiczna może wymagać dodania odpowiedniego bufora (wodorowęglanu sodu lub diwodorofosforanu potasu), jeżeli jej poziom kwasowości lub zasadowości jest niski, w celu utrzymania pH w naczyniu napowietrzającym w trakcie badania na poziomie ok. $7,5 \pm 0,5$. Ilość dodawanego bufora oraz moment jego dodania należy określić indywidualnie w każdym przypadku. Jeśli mieszaniny dodawane są w sposób stały lub przerywany, poziom DOC (lub ChZT) mieszaniny musi być utrzymywany na mniej więcej tym samym poziomie, np. poprzez rozcieńczanie wodą.

Ścieki syntetyczne

28. Rozpuścić w każdym litrze wody wodociągowej: pepton, 160 mg; ekstrakt mięsa, 110 mg; mocznik, 30 mg; bezwodny wodorofosforan potasu (K_2HPO_4), 28 mg; chlorek sodu (NaCl), 7 mg; dwuwodny chlorek wapnia ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$), 4 mg; siedmiowodny siarczan magnezu ($Mg_2SO_4 \cdot 7H_2O$), 2 mg. Ten ściek syntetyczny OECD jest mieszaniną przykładową i daje średnie stężenie DOC we wcieku na poziomie ok. 100 mg/l. Alternatywnie można wykorzystać inne składy o zbliżonym stężeniu DOC, które bardziej odpowiadają prawdziwym ściekom. Jeśli wymagany jest mniej stężony wciek, należy przy wykorzystaniu wody wodociągowej rozcieńczyć ściek syntetyczny, na przykład w stosunku 1:1, tak aby uzyskać stężenie ok. 50 mg/l. Taki słabszy wciek umożliwi lepszy wzrost organizmów nityfikujących i modyfikację tę należy stosować w przypadku badania symulacji oczyszczalni ścieków wykorzystujących nityfikację. Taki ściek syntetyczny można przygotować w wodzie destylowanej w postaci skoncentrowanej i przechowywać w temperaturze ok. 1 °C przez maksymalnie jeden tydzień. W razie potrzeby należy go rozcieńczyć wodą wodociągową. (Ta pożywka nie jest satysfakcjonująca, np. stężenie azotu jest bardzo wysokie, a zawartość węgla dość niska, ale nie można zaproponować niczego lepszego poza ewentualnym dodaniem większej ilości fosforanu jako bufora i dodatkowego peptonu).

Ścieki domowe

29. Wykorzystać świeżo osadzone ścieki zbierane codziennie z oczyszczalni ścieków przyjmującej głównie ścieki domowe. Ścieki powinny być zbierane przed wstępną sedymentacją z przelewu osadnika wstępnego lub z materiału doprowadzanego do instalacji osadu czynnego i zasadniczo nie powinny zawierać cząstek gruboziarnistych. Ścieki można stosować po przechowywaniu ich przez kilka dni (ale zasadniczo nie dłużej niż siedem dni) w temperaturze ok. 4 °C, po sprawdzeniu, czy DOC (lub ChZT) nie zmniejszył się znacząco (tzn. o mniej niż 20 %) w trakcie przechowywania. Aby zmniejszyć zakłócenia w układzie, przed zastosowaniem należy skorygować DOC (lub ChZT) każdej nowej partii do odpowiedniej stałej wartości, np. poprzez rozcieńczenie wodą wodociągową.

Osad czynny

30. Pobrać osad czynny do inokulacji ze zbiornika napowietrzającego dobrze funkcjonującej oczyszczalni ścieków lub z zestawu osadu czynnego o skali laboratoryjnej służącego do oczyszczania głównie ścieków domowych.

Roztwory podstawowe badanej substancji chemicznej

31. W przypadku substancji chemicznych o odpowiedniej rozpuszczalności przygotować roztwory podstawowe o właściwych stężeniach (np. 1 do 5 g/l) w wodzie dejonizowanej lub w części mineralnej ścieków syntetycznych. (W przypadku nierozpuszczalnych i lotnych substancji chemicznych zob. dodatek 5). Określić DOC i całkowity węgiel organiczny (TOC) roztworu podstawowego i powtórzyć pomiary przy każdej nowej partii. Jeśli różnica pomiędzy DOC a TOC jest większa niż 20 %, sprawdzić rozpuszczalność badanej substancji chemicznej w wodzie. Porównać DOC lub stężenie badanej substancji chemicznej mierzone za pomocą specyficznej analizy roztworu podstawowego o wartości nominalnej w celu stwierdzenia, czy odzyskiwanie jest wystarczające (zazwyczaj można spodziewać się wartości > 90 %). Sprawdzić, w szczególności w przypadku dyspersji, czy można wykorzystać DOC jako parametr analityczny, czy też możliwe jest zastosowanie wyłącznie techniki analitycznej specyficznej dla badanej substancji chemicznej. W przypadku dyspersji konieczne jest odwirowanie próbek. W każdej nowej partii zmierzyć DOC, ChZT lub poziom badanej substancji chemicznej za pomocą specyficznej metody analitycznej.
32. Określić pH roztworu podstawowego. Wartości krańcowe wskazują, że dodanie substancji chemicznej może mieć wpływ na pH osadu czynnego w układzie badawczym. W takim przypadku w celu uzyskania pH o wartości $7 \pm 0,5$ należy zneutralizować roztwór podstawowy dodając niewielkie ilości nieorganicznego kwasu lub zasady, ale unikając strącania badanej substancji chemicznej.

PROCEDURA

33. Opisano procedurę dla zestawów osadu czynnego; należy ją nieco dostosować na potrzeby układu naczyń porowatych.

Przygotowanie inokulum

34. Inokulować układ badawczy na początku badania albo osadem czynnym, albo inokulum zawierającym małe stężenie mikroorganizmów. Przechowywać napowietrzone inokulum w temperaturze pokojowej do momentu wykorzystania; zużyć w ciągu 24 h. W pierwszym przypadku pobrać próbkę osadu czynnego z naczynia napowietrzającego dobrze działającej biologicznej oczyszczalni ścieków lub z zestawu osadu czynnego o skali laboratoryjnej przyjmującego głównie ścieki domowe. Jeśli konieczna jest symulacja warunków nityfikacyjnych, pobrać osad z oczyszczalni ścieków wykorzystującej nityfikację. Określić stężenie zawiesin i – w razie potrzeby – skoncentrować osad poprzez sedymentację w taki sposób, by zminimalizować ilość dodawaną do układu badawczego. Zapewnić początkowe stężenie suchej masy na poziomie ok. 2,5 g/l.
35. W drugim przypadku użyć między 2 ml/l a 10 ml/l odpływu z przydomowej biologicznej oczyszczalni ścieków jako inokulum. Dla uzyskania jak najbardziej zróżnicowanych gatunków bakterii można dodać inokula z różnych innych źródeł, na przykład wody powierzchniowej. W takim przypadku osad czynny w układzie badawczym rozwinie się i urośnie.

Dawkowanie pożywki organicznej

36. Sprawdzić, czy pojemniki na wciek i odpływ oraz rurki z naczyń na wciek i do naczyń na odpływ są całkowicie czyste, aby uniemożliwić wzrost mikroorganizmów na początku i w trakcie trwania badania. Złożyć układy badawcze w pomieszczeniu o kontrolowanej temperaturze (zazwyczaj w zakresie 20–25 °C) lub wykorzystać zestawy w płaszczu wodnym. Przygotować odpowiednią ilość koniecznej pożywki organicznej (pkt 27–29). Wstępnie napełnić naczynie napowietrzające i osadnik pożywką organiczną i dodać inokulum (pkt 34, 35). Rozpocząć napowietrzanie w taki sposób, by osad był utrzymywany w zawieszeniu i w stanie tlenowym, rozpocząć dozowanie wcieku i recykling osadzonego osadu. Dawkować pożywkę organiczną ze zbiorników magazynujących do zbiorników napowietrzających (pkt 20, 21) zestawów badawczych i kontrolnych i zebrać odpływy w podobnych zbiornikach magazynujących. W celu uzyskania normalnego 6-godzinnego hydraulicznego czasu retencji pożywkę organiczną pompuje się w tempie 0,5 l/h. W celu potwierdzenia tego tempa mierzyć dzienną ilość dozowanej pożywki organicznej, odnotowując zmniejszenie ilości pożywki w zbiornikach magazynujących. Inne tryby dozowania konieczne są do określenia skutków przerywanego uwalniania i »uderzeniowego« podawania substancji chemicznych.
37. Jeśli pożywka organiczna przygotowywana jest do użytku przez okres dłuższy niż 1 dzień, konieczne jest schładzanie w temperaturze ok. 4 °C lub stosowanie innych odpowiednich metod konserwacji w celu zapobieżenia wzrostowi mikroorganizmów i biodegradacji poza zestawami badawczymi (pkt 29). W przypadku stosowania ścieków syntetycznych można przygotować i przechowywać w temperaturze ok. 4 °C stężony roztwór podstawowy (np. 10-krotność normalnego stężenia, pkt 28). Taki roztwór podstawowy można zmieszać przed użyciem z odpowiednią ilością wody wodociągowej; alternatywnie, można go wpompować bezpośrednio przy jednoczesnym osobnym podawaniu wody wodociągowej.

Dawkowanie badanej substancji chemicznej

38. Dodać odpowiednią ilość roztworu podstawowego badanej substancji chemicznej (pkt 31) do naczynia magazynującego z wciekiem lub dawkować bezpośrednio oddzielną pompą do naczynia napowietrzającego. Normalne średnie stężenie badawcze wcieku powinno wynosić pomiędzy 10 mg/l a 20 mg/l DOC, przy czym górna wartość nie może przekraczać 50 mg/l. Jeśli rozpuszczalność badanej substancji chemicznej w wodzie jest niska lub prawdopodobne jest wystąpienie efektów toksycznych, zmniejszyć stężenie do 5 mg/l DOC lub nawet mniejszej wartości, ale tylko jeśli dostępna i wykorzystywana jest odpowiednia szczególna metoda analityczna (zdyspergowane badane substancje chemiczne, które są słabo rozpuszczalne w wodzie, mogą być dodawane przy użyciu specjalnych technik dawkowania, zob. dodatek 5).
39. Rozpocząć dodawanie badanej substancji chemicznej po okresie, w którym system ustabilizował się i wydajnie usuwa DOC z pożywki organicznej (ok. 80 %). Przed dodaniem badanej substancji chemicznej ważne jest sprawdzanie, czy wszystkie zestawy działają tak samo wydajnie; jeśli nie, skutecznym rozwiązaniem jest zazwyczaj zmieszanie poszczególnych porcji osadu i ponowne podanie równych ilości do poszczególnych zestawów. Jeśli wykorzystywane jest inokulum z (około) 2,5 g/l (suchej masy) osadu czynnego, badana substancja chemiczna może być dodawana od początku badania, ponieważ bezpośrednie dodawanie wzrastających ilości od samego początku przynosi korzyść w postaci lepszego dostosowywania się osadu czynnego do badanej substancji chemicznej. Bez względu na sposób dodawania badanej substancji chemicznej zaleca się, by odpowiednie natężenie przepływu lub ilości w naczyniach magazynujących były mierzone w regularnych odstępach czasu.

Postępowanie z osadem czynnym

40. Stężenie stałego osadu czynnego stabilizuje się zazwyczaj pomiędzy wartościami granicznymi w trakcie badania, niezależnie od zastosowanego inokulum, w zakresie pomiędzy 1 a 3 g/l (suchej masy), w zależności od jakości i stężenia pożywki organicznej, warunków działania, charakteru obecnych mikroorganizmów i wpływu badanej substancji chemicznej.
41. Mierzyć zawiesiny w naczyniach napowietrzających co najmniej raz w tygodniu i usuwać nadwyżkę osadu w celu utrzymania stężenia na poziomie pomiędzy 1 g/l a 3 g/l (suchej masy) lub kontrolować średni wiek osadu utrzymując go na stałym poziomie, zazwyczaj w zakresie pomiędzy 6 a 10 dni. Jeśli wybierze się na przykład 8-dniowy czas retencji osadu, codziennie należy usuwać 1/8 objętości osadu czynnego ze zbiornika napowietrzającego i odrzucać go. Działania te należy przeprowadzać codziennie, lub – w miarę możliwości – przy wykorzystaniu automatycznej pompy działającej w sposób przerywany. Utrzymanie stężenia zawiesiny na stałym poziomie lub pomiędzy bliskimi wartościami granicznymi nie pozwala na zachowanie stałego czasu retencji osadu, który jest zmienną operacyjną określającą wartość stężenia badanej substancji chemicznej w odpływie.
42. W trakcie trwania badania usuwać co najmniej raz dziennie cały osad przylegający do ścian naczynia napowietrzającego i osadnika, tak by osad pozostawał w stanie zawieszonym. Regularnie kontrolować i oczyszczać wszystkie rurki w celu zapobieżenia wzrostowi biofilmu. Przenosić poddany sedymentacji osad z osadnika z powrotem do naczynia napowietrzającego, najlepiej przy wykorzystaniu pompy pracującej w sposób przerywany. W układzie naczyń porowatych nie zachodzi recykling, ale należy zadbać, by włożyć czyste naczynia, zanim poziom w naczyniu znacząco wzrośnie (pkt 21).
43. W zestawach Husmanna może występować słaba sedymentacja i degradacja osadu. Sytuacji tej można zaradzić poprzez zastosowanie co najmniej jednego z poniżej wymienionych działań, jednocześnie w zestawach badawczych i kontrolnych:

- można dodawać w regularnych odstępach, np. co tydzień, świeży osad lub flokulant (np. 50 g/l FeCl_3 w ilości 2 ml/naczynie), lecz należy zadbać, by nie nastąpiła żadna reakcja czy też wytrącanie osadu w wyniku reakcji pomiędzy badaną substancją chemiczną a FeCl_3 ,
- podnośnik powietrzny można zastąpić pompą perystaltyczną, co umożliwi przepływ recyrkulacyjny osadu mniej więcej równoważny przepływowi wcieku i pozwala na rozwinięcie strefy beztlenowej w osadzie poddanym sedymentacji (geometria podnośnika powietrznego ogranicza minimalne natężenie przepływu zwróconego osadu do ok. 12-krotności natężenia przepływu wcieku),
- można pompować osad w sposób przerywany z osadnika do naczynia napowietrzającego (np. 5 min. co 2,5 h) w celu zwrotu 1 l/h do 1,5 l/h,
- można wykorzystać nietoksyczną substancję przeciwpiantowórczą w minimalnym stężeniu w celu zapobieżenia stracie wskutek pienienia (np. olej silikonowy),
- można przepuścić powietrze przez osad w osadniku w krótkich uderzeniowych porcjach (np. przez 10 sek., co godzinę),
- można w regularnych odstępach podawać pożywkę organiczną do naczynia napowietrzającego (np. przez 3–10 min co godzinę).

Pobieranie próbek i analiza

44. Mierzyć w regularnych odstępach stężenie rozpuszczonego tlenu, temperaturę i pH osadu czynnego w naczyniach napowietrzających. Zapewnić stałą dostępność wystarczającej ilości tlenu (> 2 mg/l) i temperaturę w odpowiednim zakresie (normalnie od 20°C do 25°C). Utrzymać pH na poziomie $7,5 \pm 0,5$, dawkując niewielkie ilości nieorganicznej zasady lub kwasu do naczynia napowietrzającego lub do wcieku, lub zwiększając pojemność buforową pożywki organicznej (zob. pkt 27). Jeśli zachodzi nityfikacja, wytwarzany jest kwas, utlenienie 1 mg N powoduje wytworzenie odpowiednika ok. 7 mg CO_3^- . Częstotliwość pomiarów zależy od mierzonych parametrów oraz stabilności systemu i możliwe jest występowanie różnic pomiędzy pomiarami dziennymi i tygodniowymi.
45. Zmierzyć DOC lub ChZT we wciekach do naczyń kontrolnych i badawczych. Zmierzyć stężenie badanej substancji chemicznej we wcieku w zestawie badawczym przy wykorzystaniu analizy właściwej lub oszacować je ze stężenia w roztworze podstawowym (pkt 31), wykorzystanej pojemności i ilości ścieków dawkowanych do zestawu badawczego. Zaleca się obliczenie stężenia badanej substancji chemicznej w celu zmniejszenia zmienności danych dotyczących stężenia.
46. Pobrać odpowiednie próbki z zebranego odpływu (np. 24-godzinna próbka zbiorcza) i przefiltrować je przez membranę o wielkości porów $0,45 \mu\text{m}$ lub odwirować je przy ok. $40\,000 \text{ m/s}^2$ przez ok. 15 min. Jeśli filtrowanie sprawia trudności, należy zastosować wirowanie. Określić DOC lub ChZT co najmniej dwukrotnie w celu zmierzenia ostatecznej biodegradacji i, o ile to konieczne, pierwotnej biodegradacji, w drodze analizy specyficznej dla badanej substancji chemicznej.
47. Zastosowanie ChZT może spowodować powstanie trudności analitycznych przy niskich stężeniach i dlatego zalecane jest wyłącznie, jeśli wykorzystuje się odpowiednio wysokie stężenie badawcze (ok. 30 mg/l). Ponadto w przypadku mocno adsorbujących substancji chemicznych zaleca się, by ilość adsorbowanej substancji chemicznej w osadzie była mierzona przy wykorzystaniu techniki analitycznej specyficznej dla badanej substancji chemicznej.
48. Częstotliwość pobierania próbek zależy od oczekiwanej długości trwania badania. Zalecana jest częstotliwość trzy razy w tygodniu. Jeśli zestawy działają wydajnie, należy przeznaczyć okres od 1 do maksymalnie 6 tygodni po wprowadzeniu badanej substancji chemicznej na osiągnięcie stanu ustalonego. W celu oceny wyniku badania uzyskać co najmniej 15 ważnych wartości w fazie plateau (pkt 59) trwającej normalnie 3 tygodnie. Badanie można zakończyć po osiągnięciu odpowiedniego stopnia eliminacji (np. $> 90\%$) i uzyskaniu tych 15 wartości odpowiadających analizom przeprowadzonym w każdym dniu roboczym przez 3 tygodnie. Normalnie okres trwania badania nie powinien przekraczać 12 tygodni po dodaniu badanej substancji chemicznej.
49. Jeśli osad ulegnie nityfikacji oraz jeśli zbadany ma być wpływ badanej substancji chemicznej na nityfikację, przeanalizować co najmniej raz w tygodniu próbki z odpływu zestawów badawczych i kontrolnych pod kątem soli amonowych lub azotynów i azotanów.
50. Wszystkie analizy, szczególnie określenie poziomu azotu, należy przeprowadzać tak szybko, jak to tylko możliwe. Jeśli analizy muszą być przesunięte w czasie, próbki należy przechowywać w temperaturze ok. 4°C w ciemności, w pełnych i szczelnie zamkniętych butelkach. Jeśli próbki muszą być przechowywane przez ponad 48 h, zabezpieczyć je poprzez zamrożenie, zakwaszenie (np. stosując 10 ml/l roztworu kwasu siarkowego o stężeniu 400 g/l) lub dodanie odpowiedniej substancji toksycznej (np. 20 ml/l roztworu chlorku rtęci(II) o stężeniu 10 g/l). Zadbać, by technika zabezpieczenia nie miała wpływu na wyniki analizy.

Łączenie zestawów badawczych

51. Jeśli stosowane jest łączenie (dodatek 3), wymieniać codziennie tę samą ilość osadu czynnego (150 ml do 1 500 ml w przypadku naczyń napowietrzających zawierających 3 litry płynu) pomiędzy naczyniami napowietrzającymi zestawu badawczego i jego zestawu kontrolnego. Jeśli badana substancja chemiczna adsorbuje silnie do osadu, wymienić tylko supernatant osadników. W obydwu przypadkach zastosować współczynnik korygujący do obliczenia wyników badania (pkt 55).

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Obróbka wyników

52. Obliczyć wartość procentową eliminacji DOC lub ChZT badanej substancji chemicznej w odniesieniu do każdej ocy w czasie, wykorzystując równanie:

$$D_t = \frac{C_s - (E - E_o)}{C_s} \times 100$$

gdzie:

D_t = % eliminacji DOC lub ChZT w czasie t ,

C_s = DOC lub ChZT we wcieku w wyniku działania badanej substancji chemicznej, najlepiej oszacowane z roztworu podstawowego (mg/l),

E = mierzona wartość DOC lub ChZT w badanym odpływie w czasie t (mg/l),

E_o = mierzona wartość DOC lub ChZT w kontrolnym odpływie w czasie t (mg/l).

53. Stopień eliminacji DOC lub ChZT w pożywce organicznej w zestawie kontrolnym to informacja przydatna przy ocenianiu aktywności biodegradacyjnej osadu czynnego w trakcie badania. Obliczyć wartość procentową eliminacji z równania:

$$D_B = \frac{C_M - E_o}{C_M} \times 100$$

gdzie:

D_B = % eliminacji DOC lub ChZT pożywki organicznej w zestawie kontrolnym w czasie t ,

C_M = DOC lub ChZT pożywki organicznej we wcieku kontrolnym (mg/l).

Opcjonalnie można obliczyć wartość procentową eliminacji DOC lub ChZT wskutek dodania pożywki organicznej oraz badanej substancji chemicznej w zestawie badawczym z równania:

$$D_T = \frac{C_T - E}{C_T} \times 100$$

gdzie:

D_T = % eliminacji DOC lub ChZT całości wcieku badawczego,

C_T = DOC lub ChZT całości wcieku badawczego lub wartość obliczona z roztworów podstawowych (mg/l).

54. Obliczyć usunięcie badanej substancji chemicznej, jeśli pomiaru dokonywano przy wykorzystaniu swoistej metody analitycznej przy każdym pomiarze w czasie, z równania:

$$D_{ST} = \frac{S_i - S_e}{S_i} \times 100$$

gdzie:

D_{ST} = % pierwotnej eliminacji badanej substancji chemicznej w czasie t ,

S_i = mierzone lub szacowane stężenie badanej substancji chemicznej w badanym wcieku (mg/l),

S_e = mierzone stężenie badanej substancji chemicznej w badanym wcieku w czasie t (mg/l).

55. Jeśli wykorzystano tryb połączenia, wyrównać rozcieńczenie badanej substancji chemicznej w naczyniu napowietrzającym przez wymianę osadu z zastosowaniem współczynnika korygującego (zob. dodatek 3). Jeśli zastosowano średni hydrauliczny czas retencji trwający 6 h i wymianę połowy objętości osadu czynnego w naczyniu napowietrzającym, stwierdzone dzienne wartości eliminacji (D_t , pkt 52) muszą zostać skorygowane w celu otrzymania prawdziwego stopnia eliminacji – D_{tc} – badanej substancji chemicznej z równania:

$$D_{tc} = \frac{4D_t - 100}{3}$$

Prezentacja wyników badania

56. Przedstawić w postaci wykresu wartość procentową eliminacji D_t (lub D_{tc}) oraz D_{st} , jeśli jest dostępna, w stosunku do czasu (zob. dodatek 2). Z kształtu krzywej eliminacji badanej substancji chemicznej (*per se* lub jako DOC) można wyciągnąć pewne wnioski co do procesu usuwania.

Adsorpcja

57. Jeśli od początku badania obserwuje się wysoką eliminację DOC, badana substancja chemiczna jest prawdopodobnie eliminowana w drodze adsorpcji do stałego osadu czynnego. Można to udowodnić poprzez określenie adsorbowanej badanej substancji chemicznej w drodze analizy właściwej. Wysoki poziom eliminacji DOC adsorbowlanych substancji chemicznych podczas całego badania nie jest typowy; zazwyczaj na początku usuwanie zachodzi w dużym stopniu, który następnie spada do równomiernego poziomu. Jednak jeśli adsorbowlana substancja chemiczna spowodowała jakiś rodzaj przystosowania populacji bakterii, poziom eliminacji DOC badanej substancji chemicznej ulegałby stopniowemu wzrostowi i osiągał wysoki poziom plateau.

Faza zastoju

58. Tak samo jak w przypadku statycznych badań przesiewowych, wiele badanych substancji chemicznych wymaga fazy zastoju przed wystąpieniem pełnej biodegradacji. W fazie zastoju następuje przystosowanie lub adaptacja bakterii prowadzących proces degradacji przy jednoczesnym prawie całkowitym braku usuwania badanej substancji chemicznej; następnie zachodzi wstępny wzrost tych bakterii. Zakłada się, że ta faza kończy się, a zaczyna faza degradacji, kiedy następuje usunięcie ok. 10 % wstępnej ilości badanej substancji chemicznej (po adsorpcji, o ile takowa wystąpi). Faza zastoju jest często bardzo zmienna i słabo odtwarzalna.

Faza plateau

59. Faza plateau na krzywej eliminacji w teście ciągłym definiowana jest jako ta faza, w której następuje maksymalna degradacja. Faza plateau powinna trwać co najmniej 3 tygodnie i należy w jej trakcie dokonać około 15 ważnych pomiarów wartości.

Średni stopień eliminacji badanej substancji chemicznej

60. Obliczyć średnią wartość z wartości eliminacji (D_t) badanej substancji chemicznej w fazie plateau. W zaokrągleniu do najbliższej liczby całkowitej (1 %) stanowi ona stopień eliminacji badanej substancji chemicznej. Zaleca się również obliczenie 95 % przedziału ufności średniej wartości.

Eliminacja pożywki organicznej

61. Przedstawić w postaci wykresu wartość procentową eliminacji DOC lub ChZT pożywki organicznej w zestawie kontrolnym (D_B) w stosunku do czasu. Wskazać średni stopień eliminacji w taki sam sposób jak w odniesieniu do badanej substancji chemicznej (pkt 60).

Wskazywanie na biodegradację

62. Jeśli substancja chemiczna nie adsorbuje w znaczącym stopniu do osadu czynnego, a krzywa eliminacji ma typowy kształt krzywej biodegradacji z fazami zastoju, degradacji i plateau (pkt 58, 59), zmierzoną eliminację można bezpiecznie przypisać biodegradacji. Jeśli zaszło znaczne wstępne usuwanie, badanie symulacyjne nie może dokonywać rozróżnienia pomiędzy procesami eliminacji biologicznej i abiotycznej. W takich przypadkach, a także w innych sytuacjach, kiedy zachodzi wątpliwość co do biodegradacji (np. jeśli występuje odpędzanie), przeanalizować adsorbowane badane substancje chemiczne lub przeprowadzić dodatkowe statyczne badania biodegradacji w oparciu o parametry wyraźnie wskazujące na procesy biologiczne. Takie badania to metoda pobierania tlenu (rozdz. C.4 D, E i F niniejszego załącznika (6)), badanie z pomiarem wytwarzania dwutlenku węgla (rozdział C.4 C niniejszego załącznika (6)) lub metoda ISO pomiaru dwutlenku węgla w przestrzeni nad roztworem (18) wykorzystująca preinkubowane inokulum z badania symulacyjnego. Jeśli zmierzone zostało zarówno usunięcie DOC, jak i usunięcie właściwej substancji chemicznej, znaczące różnice (pierwsza wartość jest niższa niż druga) pomiędzy wartościami procentowymi wskazują obecność w odpływach pośrednich produktów organicznych, które mogą być trudniejsze w degradacji niż pierwotna substancja chemiczna.

Ważność wyników badania

63. Informacje na temat normalnej biodegradacji inokulum uzyskuje się, jeśli określi się stopień eliminacji pożywki organicznej (pkt 53) w zestawie kontrolnym. Badanie uznaje się za ważne, jeśli stopień eliminacji DOC lub ChZT w zestawie kontrolnym (zestawach kontrolnych) wynosi $> 80\%$ po dwóch tygodniach i nie zaobserwowano żadnych nietypowych zjawisk.
64. Jeśli zastosowano szybko biodegradowalną (referencyjną) substancję chemiczną, stopień biodegradacji (D_t , pkt 52) powinien wynieść $> 90\%$.
65. Jeśli badanie przeprowadzane jest w warunkach nityfikujących, średnie stężenie w odpływach powinno wynosić < 1 mg/l azotu w postaci amoniaku i < 2 mg/l azotu w postaci azotynu.
66. Jeśli te kryteria (pkt 63–65) nie są spełnione, powtórzyć badanie, wykorzystując inokulum z innego źródła, zbadać substancję odniesienia i dokonać przeglądu wszystkich procedur eksperymentu.

Sprawozdanie z badania

67. Sprawozdanie z badania musi zawierać następujące informacje:

Badana substancja chemiczna

- dane identyfikacyjne,
- charakter fizyczny i w razie potrzeby własności fizykochemiczne.

Warunki badania

- typ układu badawczego; wszelkie modyfikacje w przypadku badania nierozpuszczalnych i lotnych substancji chemicznych,
- typ pożywki organicznej,
- proporcja i charakter ścieków przemysłowych obecnych w ściekach, jeśli są znane,
- inokulum: charakter i miejsce (miejsca) pobierania próbek, stężenie i wszystkie operacje przygotowania wstępnego,
- roztwór podstawowy badanej substancji chemicznej; zawartość DOC i ChZT; sposób przygotowywania, jeśli jest to zawiesina; wykorzystane stężenie badawcze; powody zastosowania wartości DOC poza zakresem 10–20 mg/l; metoda dodawania; data pierwszego dodania; ewentualne zmiany,
- średni wiek osadu i średni hydrauliczny czas retencji; metoda degradacji osadu; metoda likwidowania pęcznienia, utraty osadu itp.,
- zastosowane techniki analityczne,
- temperatura badania,
- cechy pęcznienia osadu, indeks objętościowy osadu (SVI), zawartość zawiesin w komorze osadu czynnego (MLSS),
- wszelkie odchylenia od standardowych procedur i wszelkie okoliczności, które mogły mieć wpływ na wyniki.

Wyniki badania

- wszystkie mierzone dane (DOC, ChZT, analizy właściwe, pH, temperatura, stężenie tlenu, zawiesiny, substancje chemiczne zawierające azot, w stosownych przypadkach),
- wszystkie obliczone wartości D_t (lub D_{t0}), D_B , D_{St} otrzymane w formie tabelarycznej i krzywe eliminacji,
- informacje na temat faz zastoju i faz plateau, długość trwania badania, stopień eliminacji badanej substancji chemicznej i pożywki organicznej w zestawie kontrolnym wraz z informacjami statystycznymi i potwierdzeniami biodegradowalności i ważności badania,
- omówienie wyników.

BIBLIOGRAFIA:

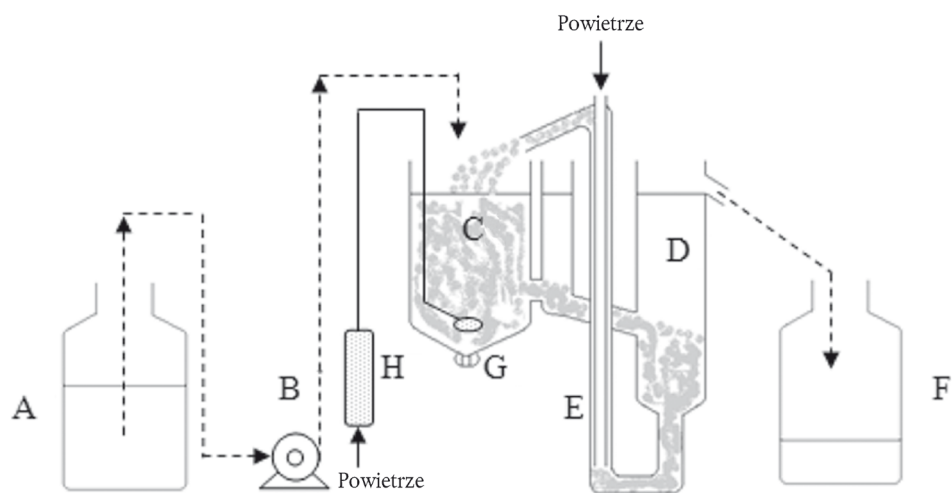
- (1) Swisher RD (1987). »Surfactant Biodegradation«, wydanie drugie, Marcel Dekker Inc. Nowy Jork, 1085 s.
 - (2) Rząd niemiecki (1962). Rozporządzenie w sprawie degradowalności detergentów w środkach myjących i czyszczących. Bundesgesetzblatt, część 1, nr 49: 698-706.
 - (3) Painter HA i King EF (1978a). WRc porous-pot method for assessing biodegradability. Technical Report No.70, Water Research Centre, Medmenham, Zjednoczone Królestwo.
 - (4) Painter HA i King EF (1978b). The effect of phosphate and temperature on growth of activated sludge and on biodegradation of surfactants. Wat. Res. 12: 909-915.
 - (5) Eckenfelder, W.W (19) US EPA.
 - (6) Rozdział C.4 niniejszego załącznika: Oznaczenie szbkiej biodegradowalności.
 - (7) Rozdział C.12 niniejszego załącznika: Biodegradacja – zmodyfikowane badanie SCAS.
 - (8) Rozdział C.19 niniejszego załącznika: Oszacowanie współczynnika adsorpcji (K_{OC}) na glebie i w osadzie ściekowym przy zastosowaniu wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC)
 - (9) Gerike P i Fischer WK (1979). A correlation study of biodegradability determinations with various chemicals in various tests. Ecotox. Env. Saf. 3: 157-173.
 - (10) Gerike P i Fischer WK (1981), as (9), II Additional results and conclusions. Ecotox. Env. Saf. 5: 45-55.
 - (11) Painter HA i Bealing D (1989). Experience and data from the OECD activated sludge simulation test. s. 113-138, [w]: Laboratory tests for simulation of water treatment processes. CEC Water Pollution Report 18. [red.] Jacobsen BN, Muntau H, Angeletti G.
 - (12) ISO 11733 (1995; zmieniony 2004). Oznaczanie eliminacji i biodegradacji związków organicznych w środowisku wodnym – Test symulacyjny z osadem czynnym.
 - (13) Birch RR (1982). The biodegradability of alcohol ethoxylates. XIII Jornado Com. Espanol. Deterg.: 33-48.
 - (14) Birch RR (1984). Biodegradation of nonionic surfactants. J.A.O.C.S. 61 (2): 340-343.
 - (15) Gerike P, Fischer WK i Holtmann W (1980). Biodegradability determinations in trickling filter units compared with the OECD confirmatory test. Wat.Res. 14: 753-758.
 - (16) Baumann U, Kuhn G i Benz M. (1998). Einfache Versuchsanordnung zur Gewinnung gewässerökologisch relevanter Daten, UWSF – Z. Umweltchem. Ökotox. 10: 214-220.
 - (17) Her Majesty's Stationery Office (1982). Assessment of biodegradability. Methods for the examination of waters and associated materials. s. 91-98 ISBN 011 751661 9.
 - (18) ISO 14593 (1998). Water Quality - Evaluation in an aqueous medium of the ultimate biodegradability of organic compounds. Method by the analysis of inorganic carbon in sealed vessels.
-

Dodatek 1

Rysunek 1

Oprzężenie stosowane do oceny biodegradowalności

Zestaw Husmanna

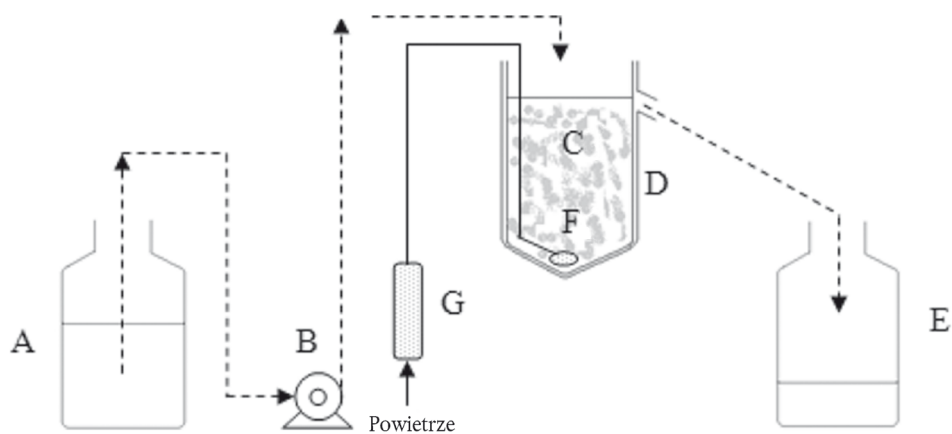


- | | |
|--|----------------------------------|
| A. Naczynie magazynujące | E. Podnośnik powietrzny |
| B. Pompa dozująca | F. Naczynie do zbierania odpływu |
| C. Komora napowietrzania (pojemność 3 l) | G. Napowietrzacz |
| D. Osadnik | H. Miernik przepływu powietrza |

Rysunek 2

Oprzężenie stosowane do oceny biodegradowalności

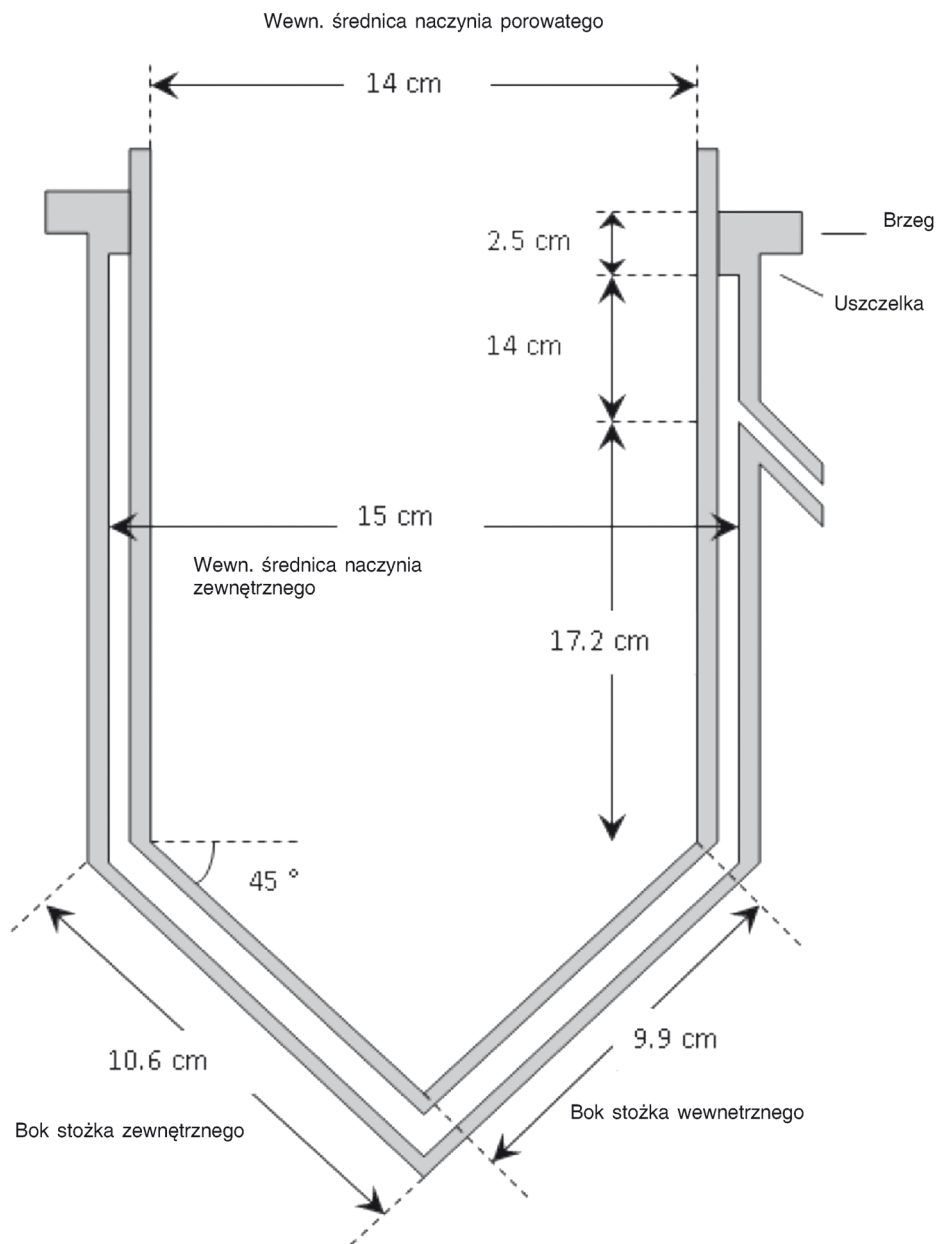
Naczynie porowate



- | | |
|--|----------------------------------|
| A. Naczynie magazynujące | F. Naczynie do zbierania odpływu |
| B. Pompa dozująca | F. Dyfuzor |
| C. Porowate naczynie do napowietrzania | G. Miernik przepływu powietrza |
| D. Zewnętrzne nieprzepuszczalne naczynie | |

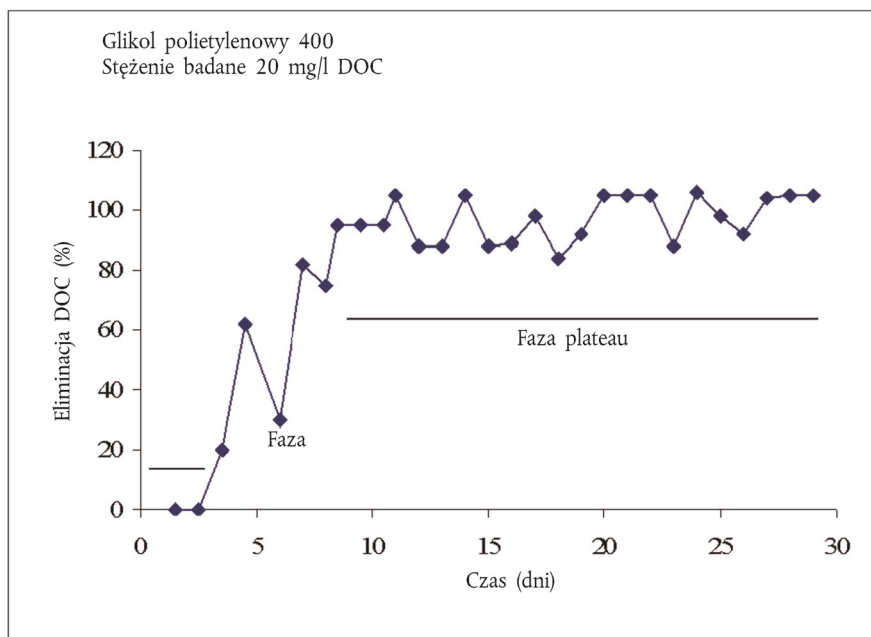
Rysunek 3

Szczegóły budowy 3-litrowego naczynia porowatego do napowietrzania



Dodatek 2

Przykład krzywej eliminacji



Dodatek 3

[INFORMACYJNY]

ŁĄCZENIE ZESTAWÓW BADAWCZYCH

W celu zrównoważenia populacji bakteryjnych w osadzie w zestawie badawczym, do którego wprowadza się ścieki i badaną substancję chemiczną, oraz w zestawie kontrolnym, do którego wprowadza się tylko ścieki, wprowadzono codzienną wymianę osadu (1). Procedurę tę nazwano łączeniem, a metoda znana jest jako zestawy łączone. Pierwotnie łączenie stosowano do zestawów osadu czynnego Husmanna, ale używano go również do zestawów z naczyniami porowatymi (2) (3). Nie odnotowano znaczących różnic w wynikach zestawów niełączonych i łączonych, zarówno w przypadku zestawów Husmanna, jak i zestawów naczyń porowatych, tak więc wydatkowanie czasu i energii na łączenie zestawów nie przynosi żadnych korzyści.

Wymiana osadu może pozornie powodować znaczące usuwanie, ponieważ część badanej substancji chemicznej jest przenoszona, a stężenia badanej substancji w odpływie badanym i kontrolnym stają się niemal równe. Dlatego też konieczne jest stosowanie współczynników korygujących, które uzależnione są od wymienianej frakcji i średniego hydraulicznego czasu retencji. Opublikowano szczegółowe informacje na temat wyliczeń (1).

Obliczyć skorygowany stopień eliminacji DOC lub ChZT używając ogólnego wzoru:

$$D_{tc} = (D_t - 100 \cdot a \cdot r/12)/(1 - a \cdot r/12) \%$$

gdzie:

D_{tc} = skorygowany % eliminacji DOC lub ChZT,

D_t = określony % eliminacji DOC lub ChZT,

a = wymieniona frakcja objętości zestawów osadu czynnego,

r = średni hydrauliczny czas retencji (h).

Jeśli na przykład połowa pojemności naczynia napowietrzającego jest wymieniana ($a = 0,5$), a średni hydrauliczny czas retencji wynosi 6 h, prawidłowy wzór to:

$$D_{tc} = \frac{4D_t - 100}{3}$$

BIBLIOGRAFIA

- (1) Fischer W, Gerike P, Holtmann W (1975). Biodegradability Determinations via Unspecific Analyses (Chemical Oxygen Demand, DOC) in Coupled Units of the OECD Confirmatory Test. I The test. Wat. Res. 9: 1131-1135.
- (2) Painter HA i Bealing D (1989). Experience and data from the OECD activated sludge simulation test. s. 113-138, [w]: Laboratory tests for simulation of water treatment processes. CEC Water Pollution Report 18. [red.] Jacobsen BN, Muntau H, Angeletti G.
- (3) Painter HA, King EF (1978). Water Research Centre Porous Pot Method for Assessing Biodegradability. Technical Report TR70, Water Research Centre, Stevenage, Zjednoczone Królestwo.

Dodatek 4

OCENA HAMOWANIA OSADU CZYNNEGO

Procedura z udziałem badanych substancji chemicznych

1. Substancja chemiczna (lub ściek) mogą nie ulegać degradacji ani usuwaniu w badaniu symulacyjnym i mogą wręcz mieć wpływ hamujący na mikroorganizmy w osadzie. Inne substancje chemiczne ulegają biodegradacji w niskich stężeniach, ale mają działanie hamujące w stężeniach wyższych (hormeza). Działanie hamujące może ujawnić się na wcześniejszym etapie lub może zostać stwierdzone dzięki zastosowaniu badania toksyczności przy użyciu inokulum podobnego lub identycznego jak to stosowane w badaniu symulacyjnym (1). Metody te to hamowanie pobierania tlenu (rozdział C.11 niniejszego załącznika (2) oraz ISO 8192(3)) lub hamowanie wzrostu organizmów w osadzie (ISO 15522 (4)).
2. W badaniu symulacyjnym wszelkie działanie hamujące wyraża się jako różnica poziomu rozpuszczonego węgla organicznego (DOC) lub chemicznego zapotrzebowania na tlen (ChZT) pomiędzy odpływem z naczynia badawczego i z kontrolnego przekraczająca ilość DOC w substancji dodanej jako badana substancja chemiczna. Inaczej mówiąc, wartość procentowa usunięcia DOC (i biochemicznego zapotrzebowania na tlen BZT, chemicznego zapotrzebowania na tlen ChZT lub NH_4^+) w poddawanej działaniu pożywce organicznej zmniejszy się w obecności badanej substancji chemicznej. Jeśli to nastąpi, należy powtórzyć badanie, zmniejszając stężenie badanej substancji chemicznej do momentu osiągnięcia poziomu, na którym nie występuje hamowanie, i ewentualnie dalej zmniejszając stężenie do momentu biodegradacji badanej substancji chemicznej. Jednakże jeśli badana substancja chemiczna (lub ściek) ma negatywny wpływ na proces we wszystkich badanych stężeniach, sugeruje to, że substancja jest trudna do oczyszczenia biologicznego, lub też że jest ono niemożliwe, jednak warto powtórzyć badanie przy wykorzystaniu osadu czynnego z innego źródła lub poddać osad bardziej stopniowemu przystosowaniu.
3. Z kolei jeśli badana substancja chemiczna ulega bioeliminacji przy pierwszej próbie przeprowadzenia badania symulacyjnego, jej stężenie należy zwiększyć, jeśli konieczne jest ustalenie, czy dana substancja chemiczna może mieć działanie hamujące.
4. Przy próbach określenia stopnia hamowania należy pamiętać, że populacja w osadzie czynnym może ulec zmianie, wskutek czego z biegiem czasu mikroorganizmy mogą rozwinąć tolerancję na substancję chemiczną o działaniu hamującym.
5. Obliczenie stopnia hamowania:

Ogólną procentową wartość usunięcia R_o BZT, DOC, ChZT itp. w zestawach testowych i kontrolnych można wyliczyć z:

$$R_o = 100 (I - E)/I \%$$

gdzie:

I = stężenie we wcieku BZT, DOC, ChZT itp. w naczyniach badawczych i kontrolnych (mg/l),
E = odpowiednie stężenia w odpływie.

I i E należy skorygować o DOC w odniesieniu do badanej substancji chemicznej w zestawach badawczych, w przeciwnym wypadku obliczenia procentowej wartości hamowania będą niepoprawne.

Stopień hamowania wywołanego obecnością badanej substancji chemicznej można obliczyć z:

$$\% \text{ hamowania} = 100 (R_c - R_t)/R_c$$

gdzie:

R_c = procentowa wartość usunięcia w naczyniach kontrolnych,
 R_t = procentowa wartość usunięcia w naczyniach badawczych.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Reynolds L *et al.* (1987). Evaluation of the toxicity of substances to be assessed for biodegradability. *Chemosphere* 16: 2259.
- (2) Rozdział C.11 niniejszego załącznika. Biodegradacja – badanie hamowania oddychania osadów czynnych.
- (3) ISO 8192 (2007) Jakość wody – Badanie hamowania zużycia tlenu przez osad czynny do utleniania związków zawierających węgiel i amon.
- (4) ISO 15522 (1999) Water Quality - Determination of the inhibitory effect of water constituents on activated sludge microorganisms.

Dodatek 5

Badane substancje chemiczne słabo rozpuszczalne w wodzie – lotne substancje chemiczne**Substancje chemiczne słabo rozpuszczalne w wodzie**

Opublikowano do tej pory niewiele raportów z poddawania substancji chemicznych słabo rozpuszczalnych i nierozpuszczalnych w wodzie badaniom symulującym oczyszczanie ścieków (1) (2) (3).

Nie istnieje jedna metoda dyspersji badanej substancji chemicznej, która miałaby zastosowanie do wszystkich nierozpuszczalnych substancji chemicznych. Dwa z czterech typów metod opisywanych w ISO 10634 (4) wydają się odpowiednio do podjęcia prób rozproszenia badanych substancji chemicznych na potrzeby badań symulacyjnych; są to zastosowanie środków emulgujących lub energii ultradźwiękowej. Należy osiągnąć co najmniej 24-godzinne okresy stabilności dyspersji. Odpowiednio ustabilizowane dyspersje znajdujące się w zbiorniku ze stałym mieszaniami (pkt 38) dawkuje się następnie do naczynia napowietrzającego oddzielnie od ścieków domowych (lub syntetycznych).

Jeśli dyspersje są stabilne, zbadać, jak można określić ilość badanej substancji chemicznej w postaci zdyspergowanej. Jest mało prawdopodobne, by odpowiednie było wykorzystanie DOC, zatem należy określić dla badanej substancji chemicznej właściwą metodę analityczną, którą można byłoby stosować do odpływów, części stałych odpływów i osadu czynnego. To, co stanie się z badaną substancją chemiczną w symulacji procesu osadu czynnego, jest wówczas determinowane w fazach ciekłych i stałych. W ten sposób ustalony zostanie »bilans masy« pozwalający określić, czy badana substancja chemiczna uległa biodegradacji. Będzie się to jednak odnosić tylko do biodegradacji pierwotnej. Należy podjąć próbę wykazania ostatecznej biodegradacji poprzez zastosowanie respirometrycznego badania szybkiej biodegradowalności (rozdział C.4 niniejszego załącznika (5) C, F lub D), wykorzystując jako inokulum osad poddany działaniu badanej substancji chemicznej w badaniu symulacyjnym.

Lotne substancje chemiczne

Zastosowanie symulacji oczyszczania ścieków do substancji lotnych jest dyskusyjne i problematyczne. Tak samo jak w przypadku badanych substancji chemicznych słabo rozpuszczalnych w wodzie, również na temat badań symulacyjnych z wykorzystaniem lotnych substancji chemicznych opublikowano niewiele raportów. Konwencjonalnego typu przyrząd do mieszania pełnego jest adaptowany poprzez uszczelnienie zbiorników napowietrzających i osadników, pomiar i kontrolę przepływu powietrza przy wykorzystaniu mierników przepływu powietrza oraz przepuszczanie gazu uchodzącego przez pułapki w celu zebrania lotnych substancji organicznych. W niektórych przypadkach wykorzystuje się pompę próżniową do przepuszczania gazu uchodzącego przez »zimną« pułapkę lub pułapkę oczyszczającą zawierającą Tenax i żel silikonowy do analiz metodą chromatografii gazowej. Obecność badanej substancji chemicznej w pułapce można określić analitycznie.

Badanie przeprowadzane jest w dwóch częściach. Zestawy działają najpierw bez osadu – do zbiornika napowietrzającego wpompowuje się tylko ścieki syntetyczne i badaną substancję chemiczną. Próbkę wcieku, odpływu i gazu uchodzącego są gromadzone i analizowane pod kątem obecności badanej substancji chemicznej przez kilka dni. Na podstawie zgromadzonych danych można obliczyć wartość procentową (R_{vs}) badanej substancji chemicznej usuniętej z układu.

Następnie przeprowadza się normalne badanie biologiczne (z osadem) w warunkach operacyjnych identycznych do warunków badania odpędzania. Wykonuje się również pomiary DOC lub ChZT w celu sprawdzenia, czy zestawy pracują wydajnie. Od czasu do czasu przeprowadza się analizy mające określić ilość badanej substancji chemicznej we wcieku, odpływie i gazie uchodzącym w pierwszej części badania; po przystosowaniu przeprowadza się częstsze analizy. Na podstawie danych w stanie ustalonym można obliczyć wartość procentową usunięcia badanej substancji chemicznej z fazy ciekłej przy wykorzystaniu wszystkich procesów (R_T) (fizycznych i biologicznych) oraz odsetek (R_V) usunięty z układu.

Obliczenie:

- a) W badaniu niebiologicznym udział procentowy (R_{VP}) badanej substancji chemicznej usuniętej z układu można obliczyć ze wzoru:

$$R_{VP} = \frac{S_{VP}}{S_{IP}} \cdot 100$$

gdzie:

R_{VP} = usunięcie badanej substancji chemicznej poprzez ulatnianie się (%),

S_{VP} = badana substancja chemiczna zgromadzona w pułapce wyrażona jako ekwiwalent stężenia w fazie płynnej (mg/l),

S_{IP} = stężenie badanej substancji chemicznej we wcieku (mg/l).

- b) W badaniu biologicznym udział procentowy (R_V) badanej substancji chemicznej usuniętej z układu można obliczyć ze wzoru:

$$R_V = \frac{S_V}{S_I} \cdot 100$$

gdzie:

R_V = usunięcie badanej substancji chemicznej poprzez ulatnianie się w badaniu biologicznym (%),

S_V = badana substancja chemiczna zgromadzona w pułapce w badaniu biologicznym, wyrażona jako ekwiwalent stężenia w płynnym wcieku (mg/l),

S_I = stężenie badanej substancji chemicznej we wcieku (mg/l).

- c) W badaniu biologicznym udział procentowy (R_T) usunięcia badanej substancji chemicznej we wszystkich procesach jest wyliczany ze wzoru:

$$R_T = 1 - \frac{S_E}{S_I} \cdot 100$$

gdzie:

S_E = stężenie badanej substancji chemicznej w (płynnym) odpływie (mg/l).

- d) Stąd też udział procentowy (R_{BA}) usunięty przez biodegradację z adsorpcją można obliczyć ze wzoru:

$$R_{BA} = (R_T - R_V)$$

Oddzielne badania należy przeprowadzić w celu określenia, czy badana substancja chemiczna podlega adsorpcji; jeśli tak, można dokonać dalszej korekty.

- e) Porównanie pomiędzy proporcjami badanej substancji chemicznej usuniętej w układach badania biologicznego (R_V) i niebiologicznego (R_{VP}) wskazuje ogólny wpływ oczyszczania biologicznego na emisję badanej substancji chemicznej do atmosfery.

Przykład: benzen

Czas retencji osadu = 4 dni

Ściek syntetyczny; czas retencji = 8 h

$$S_{IP} = S_I = 150 \text{ mg/l}$$

$$S_{VP} = 150 \text{ mg/l} \quad (S_{EP} = 0)$$

$$S_V = 22,5 \text{ mg/l}$$

$$S_E = 50 \text{ } \mu\text{g/l}$$

Stąd:

$$R_{VP} = 100 \%, \quad R_V = 15 \%$$

$$R_T = 100 \% \text{ a } R_{BA} = 85 \%$$

Przyjęto, że benzen nie ulega adsorpcji na osadzie.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Horn JA, Moyer JE, Hale JH (1970). Biological degradation of tertiary butyl alcohol. Proc. 25th Ind. Wastes Conference Purdue Univ.: 939-854.
- (2) Pitter P, Chudoba J (1990). Biodegradability of organic substances in the aquatic environment. CRC Press. Boston, USA.
- (3) Stover EL, Kincannon DF (1983). Biological treatability of specific organic compounds found in chemical industry waste waters. J. Wat. Pollut. Control Fed. 55: 97.
- (4) ISO 10634 (1995) Jakość wody – Wytyczne dotyczące przygotowania i obróbki słabo rozpuszczalnych związków organicznych w celu oceny ich biodegradacji w środowisku wodnym.
- (5) Rozdział C.4 niniejszego załącznika. Oznaczenie szybkiej biodegradowalności.

Dodatek 6

Wpływ czasu retencji osadu (CRO) na podatność substancji chemicznych na oczyszczanie

WPROWADZENIE

1. Metodę opisaną w głównej części tekstu stworzono w celu potwierdzenia, czy badane substancje chemiczne (zazwyczaj takie, o których wiadomo, że są zasadniczo biodegradowalne, ale nie ulegają szybkiej biodegradacji) mogą ulec biodegradacji w granicach nakładanych przez oczyszczalnie ścieków. Wyniki podawane są w postaci procentowej wartości usunięcia i procentowej wartości biodegradacji. Warunki działania zestawów osadu czynnego i wybór wcieku pozwalają na występowanie dość szerokiego zakresu stężeń badanej substancji chemicznej w odpływie. Badania przeprowadzane są tylko dla jednego stężenia nominalnego osadu stałego lub w odniesieniu do jednego czasu retencji osadu (CRO), a opisane schematy degradacji osadu mogą spowodować, że wartość CRO będzie ulegać znacznym zmianom w trakcie badania, zarówno w odniesieniu do wartości z kolejnych dni, jak i różnych wartości z tego samego dnia.
2. W tym wariantcie (1) (2) CRO jest kontrolowany w znacznie węższych ramach przez 24 h (tak jak dzieje się to na dużą skalę), co powoduje bardziej stałe stężenie w odpływach. Zalecane są ścieki domowe, ponieważ dają bardziej spójne i wyższe wartości procentowe usunięcia. Ponadto bada się wpływ szeregu wartości CRO i w bardziej szczegółowym badaniu można określić wpływ różnych temperatur na stężenie odpływu.
3. Nie ma zgody co do tego, jakie modele kinetyczne mają zastosowanie w sytuacji, kiedy substancje chemiczne ulegają biodegradacji w warunkach oczyszczania ścieków. Wybrano zastosowanie modelu Monoda wzrostu bakterii i użycia substratu (1) (2) do zgromadzonych danych, ponieważ metoda ta miała być stosowana tylko do substancji chemicznych produkowanych w dużych ilościach, co skutkuje stężeniami w ściekach powyżej 1 mg/l. Ważność modelu uproszczonego i poczynionych założeń stwierdzono wykorzystując szereg związków oksyetylenowanych o różnych stopniach biodegradowalności pierwotnej (2) (3).

Uwaga: Ten wariant metody jest zgodny z większością tekstu dotyczącego tej metody badawczej C.10-A, zaś poniżej podano wyłącznie te aspekty, które są odmienne.

ZASADA BADANIA

4. Zestawy osadu czynnego z naczyniami porowatymi, które mają za zadanie ułatwienie (niemal) ciągłego wytracania mieszanego płynu, pozwalają na bardzo dokładną kontrolę czasu retencji osadu (CRO lub θ_s), działają w trybie niepołączonym w odniesieniu do szerokiego zakresu czasów retencji osadu oraz, opcjonalnie, w różnych temperaturach. Czas retencji wynosi zazwyczaj od 2 do 10 dni, a temperatura od 5 do 20 °C. Ścieki, najlepiej ścieki domowe, oraz roztwór badanej substancji chemicznej dawkowane są osobno do zestawów w tempie umożliwiającym otrzymanie wymaganego czasu retencji (3 do 6 godzin) oraz wymaganego stężenia badanej substancji chemicznej we wcieku. Równocześnie, dla celów porównawczych, działają zestawy kontrolne, które nie otrzymują badanej substancji chemicznej.
5. Możliwe jest wykorzystanie innego typu przyrządów, jednak należy zachować szczególną ostrożność, by zapewnić odpowiednią kontrolę CRO. Przykładowo, przy wykorzystywaniu instalacji obejmujących odstojnik konieczne może okazać się uwzględnienie utraty części stałych z odpływu z instalacji. Ponadto należy podjąć specjalne środki ostrożności w celu uniknięcia błędów wynikających ze zmiany ilości osadu w odstojniku.
6. Zestawy pracują w określonych układach warunków i po osiągnięciu równowagi przez około trzy tygodnie uzyskuje się średnie stężenia w stanie ustalonym badanej substancji chemicznej w odpływach i – opcjonalnie – DOC. Oprócz oceniania wartości procentowej usunięcia badanej substancji chemicznej i – opcjonalnie – DOC, przedstawia się w formie graficznej stosunek pomiędzy warunkami działania instalacji a stężeniem w odpływie. Na podstawie tego można obliczyć próbne stałe kinetyczne oraz przewidzieć warunki, w jakich badana substancja chemiczna może być oczyszczana.

INFORMACJE NA TEMAT BADANEJ SUBSTANCJI CHEMICZNEJ

7. Zastosowanie ma rozdział C.10 A, pkt 12 i 13.

POZIOMY PROGOWE

8. Zastosowanie ma rozdział C.10 A, pkt 14 i 15.

BADANE SUBSTANCJE ODNIESIENIA

9. Zastosowanie ma rozdział C.10 A, pkt 16.

ODTWARZALNOŚĆ WYNIKÓW BADAŃ

10. Zastosowanie ma rozdział C.10 A, pkt 17 i 18.

OPIS METODY

Przyrząd

11. Odpowiednim zestawem jest zmodyfikowany układ naczyń porowatych (dodatek 6.1). Składa się z naczynia wewnętrznego (wkładki) z porowatego polipropylenu o grubości 3,2 mm i maksymalnej średnicy porów 90 µm, w którym złącze jest zgrzane doczołowo. (Powoduje to, że zestaw jest trwalszy niż ten opisany w pkt 21 niniejszego rozdziału, C.10 A). Wkładka umieszczona jest w nieprzepuszczalnym polietylenowym naczyniu zewnętrznym, które składa się z dwóch części: okrągłej podstawy, w której wywiercono otwory w celu zamocowania dwóch linii powietrznych i jednej linii usuwania osadu oraz górnego cylindra, który przykręcony jest do podstawy i którego wylot umieszczony jest w takim miejscu, by wskazywał znaną ilość (3 l) w naczyniu porowatym. Jedna z linii powietrznych wyposażona jest w kamień napowietrzający, a druga ma otwarte zakończenie i jest usytuowana pod kątem prostym do kamienia w naczyniu. Układ ten powoduje powstanie wystarczających turbulencji, by zapewnić, że zawartość naczynia jest całkowicie wymieszana oraz utrzymać stężenie rozpuszczonego tlenu na poziomie większym niż 2 mg/l.
12. Odpowiednią liczbę zestawów utrzymuje się w kontrolowanych temperaturach w zakresie od 5 do 20 °C (± 1 °C), w kąpeli wodnej lub w pomieszczeniach o stałej temperaturze. Do dawkowania do naczyń napowietrzających roztworu badanej substancji chemicznej oraz osadzonych ścieków w wymaganym tempie (odpowiednio 0–1,0 ml/min i 0–25 ml/min) potrzebne są pompy; trzecia pompa konieczna jest do usuwania osadu odpadowego z naczyń napowietrzających. Niezbędne bardzo wolne tempo przepływu osadu odpadowego osiąga się dzięki zastosowaniu pompy ustawionej na wyższą wartość i uruchamianej z przerwami wyłącznikiem czasowym, np. działającej przez 10 sekund na minutę; szybkość podawania 3 ml/min daje tempo degradacji 0,5 ml/min.

Przyrząd do filtrowania lub wirówka

13. Zastosowanie ma rozdział C.10 A, pkt 23.

Sprzęt do wykonywania analiz

14. Zastosowanie ma rozdział C.10 A, pkt 24.

Woda

15. Zastosowanie ma rozdział C.10 A, pkt 25 i 26.

Pożywka organiczna

16. Zastosowanie ma rozdział C.10 A, pkt 27.

Ścieki syntetyczne

17. Zastosowanie ma rozdział C.10 A, pkt 28.

Ścieki domowe

18. Zastosowanie ma rozdział C.10 A, pkt 29.

Osad czynny

19. Zastosowanie ma rozdział C.10 A, pkt 30.

Roztwory podstawowe badanej substancji chemicznej

20. Zastosowanie ma rozdział C.10 A, pkt 31 i 32.

PROCEDURA

Przygotowanie inokulum

21. Zastosowanie ma rozdział C.10 A, pkt 34 – należy zastosować osad czynny (ok. 2,5 g/l).

Liczba zestawów badawczych

22. Do przeprowadzenia prostego testu, tzn. zmierzenia wartości procentowej usunięcia, potrzebna jest tylko jedna wartość CRO, ale do tego, by uzyskać dane potrzebne do wyliczenia próbnych stałych kinetycznych, konieczne jest 4 lub 5 wartości CRO. Wybiera się zazwyczaj wartości pomiędzy 2 a 10 dni. Z praktycznego punktu widzenia wygodne jest przeprowadzenie badania na 4 lub 5 CRO jednocześnie w jednej temperaturze; w rozszerzonych

badaniach te same wartości CRO, lub inny zakres wartości, wykorzystuje się w innych temperaturach w zakresie od 5 do 20 °C. W przypadku pierwotnej biodegradacji (główne zastosowanie) konieczny jest zazwyczaj tylko jeden zestaw badawczy na jeden układ warunków. Jednakże do zbadania ostatecznej biodegradowalności potrzebny jest zestaw kontrolny do każdego układu warunków; do zestawu tego dodaje się ścieki, ale bez badanej substancji chemicznej. Jeśli zakłada się obecność badanej substancji chemicznej w używanych ściekach, konieczne jest zastosowanie zestawów kontrolnych przy ocenie pierwotnej biodegradacji i dokonanie właściwych korekt w obliczeniach.

Dawkowanie pożywki organicznej i badanej substancji chemicznej

23. Zastosowanie ma rozdział C.10 A, pkt 36–39, jednak należy zauważyć, że roztwór badanej substancji chemicznej jest dawkiowany osobno i że stosuje się różne współczynniki degradacji osadu. Należy również często, np. dwa razy dziennie, monitorować i w miarę potrzeby korygować – do $\pm 10\%$ – przepływ wcieku, odpływu i degradacji osadu. W przypadku wystąpienia trudności w stosowaniu metod analitycznych przy wykorzystywaniu ścieków domowych badanie należy przeprowadzić z wykorzystaniem ścieków syntetycznych, ale należy dopilnować, by różne media dały porównywalne dane kinetyczne.

Postępowanie z zestawami osadu czynnego

24. Zastosowanie ma rozdział C.10 A, pkt 40–43, ale CRO należy kontrolować tylko poprzez »stałą« degradację osadu.

Pobieranie próbek i analiza

25. Zastosowanie ma rozdział C.10 A, pkt 44–50, z tą różnicą, że należy określić stężenie badanej substancji chemicznej, a określenie DOC jest opcjonalne; nie należy stosować ChZT.

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Opracowanie wyników

26. Zastosowanie ma rozdział C.10 A, pkt 52–54.

Prezentacja wyników badania

27. Zastosowanie ma rozdział C.10 A, pkt 56–62.

Obliczenie stałych kinetycznych

28. Podanie średniego stężenia plateau badanej substancji chemicznej w odpływie i opisanie, jak zmienia się ono wraz z warunkami działania instalacji, jest bardziej realistycznym rozwiązaniem niż podawanie procentowej biodegradacji pierwotnej. Można tego dokonać stosując równanie (6) z dodatku 6.2, które daje wartości K_S , μ_m oraz ϑ_{SC} – krytyczną wartość czasu retencji osadu.

(Alternatywnie można otrzymać przybliżone wartości K_S i μ_m , stosując prosty program komputerowy dostosowujący teoretyczną krzywą wyliczoną z równania 2 (dodatek 6.2) do otrzymanych wartości eksperymentalnych. Mimo że żadne rozwiązanie nie będzie unikalne, można uzyskać rozsądne przybliżenie wartości K_S i μ_m).

Zmienność wyników

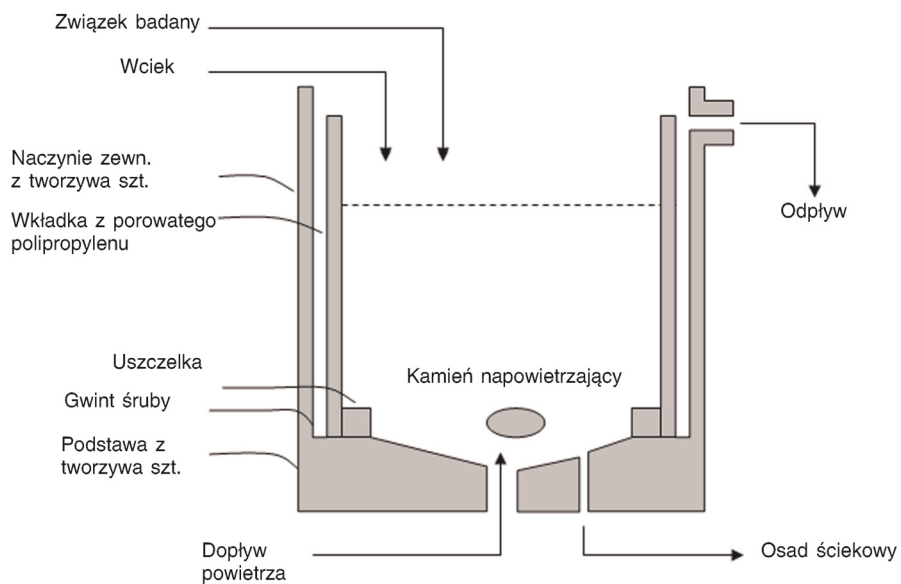
29. Powszechnie zdarza się uzyskiwanie zmiennych wartości parametrów kinetycznych poszczególnych substancji chemicznych. Uważa się, że warunki, w jakich hodowany był osad, a także warunki występujące w trakcie badania (tak jak w pkt 5 i innych badaniach) mają duży wpływ na ostateczne wyniki. Jeden z aspektów tej zmienności omówili Grady i in. (4), którzy zasugerowali, że terminy »zastany« i »swoiste« powinny być stosowane do dwóch skrajnych warunków odpowiadających wartościom granicznym stanu fizjologicznego, który kultura może osiągnąć w trakcie eksperymentu kinetycznego. Jeśli stan ten nie może zmienić się w trakcie badania, wartości parametru kinetycznego odzwierciedlają warunki w środowisku, z którego pobrano mikroorganizmy; warunki te zwane są »zastanymi« lub obecnie istniejącymi. Z kolei w odwrotnej sytuacji, jeśli warunki badania zezwalają na pełny rozwój systemu syntetyzowania białka dopuszczając maksymalne możliwe tempo wzrostu, otrzymane parametry kinetyczne określa się jako »swoiste« i są one zależne tylko od charakteru substratu i typów bakterii w kulturze. Wartości zastane uzyskuje się poprzez utrzymanie stosunku stężenia substratu do właściwych mikroorganizmów (S_0/X_0) na poziomie niskim, np. 0,025, zaś wartości swoiste powstają, kiedy stosunek ten jest wysoki i wynosi np. co najmniej 20. W obydwu przypadkach S_0 powinno być równe odpowiedniej wartości K_S – stałej półnasycecia – lub ją przekraczać.
30. Zmienność i inne aspekty kinetyki biodegradacji omawiano podczas ostatniego warsztatu SETAC (5). Dzięki takim badaniom, przeprowadzonym i planowanym, powinno być niedługo możliwe osiągnięcie jaśniejszego obrazu kinetyki w oczyszczalniach ścieków, co umożliwi lepszą interpretację istniejących badań oraz zasugeruje lepsze rozwiązania w przyszyłych metodach badawczych.

BIBLIOGRAFIA:

- (1) Birch RR (1982). The biodegradability of alcohol ethoxylates. XIII Jornado Com. Espanol. Deterg. 33-48.
 - (2) Birch RR (1984). Biodegradation of nonionic surfactants. J.A.O.C.S. 61(2): 340-343.
 - (3) Birch RR (1991). Prediction of the fate of detergent chemicals during sewage treatment. J. Chem. Tech. Biotechnol. 50: 411-422.
 - (4) Grady CPL, Smets BF and Barbeau DS (1996). Variability in kinetic parameter estimates: A review of possible causes and a proposed terminology. Wat. Res. 30 (3): 742-748.
 - (5) Biodegradation kinetics: Generation and use of data for regulatory decision making (1997). Warsztat w Port Sunlight, UK. [red.] Hales SG, Feitjel T, King H, Fox K, Verstraete W. 4-6.9.1996. SETAC-Europa, Bruksela.
-

Dodatek 6.1

Naczynie porowate z kontrolą CRO



Dodatek 6.2

Obliczanie stałych kinetycznych

1. Zakładając zastosowanie kinetyki Monoda i bilansu masy aktywnych części stałych i substratów w całym układzie z osadem czynnym (1), otrzymać można następujące stany ustalone:

$$\text{albo} \quad \frac{1}{\vartheta_s} = \frac{\mu_m \cdot S_1}{K_s + S_1} - K_d \quad [1]$$

$$S_1 = \frac{K_s \cdot (1 + K_d \cdot \vartheta_s)}{\vartheta_s \cdot (\mu_m - K_d) - 1} \quad [2]$$

gdzie:

S_1 = stężenie substratu w odpływie (mg/l),

K_s = stała półnasylenia, przy którym stężenie $\mu = \mu_m/2$ (mg/l),

μ = właściwa szybkość wzrostu (d^{-1}),

μ_m = maksymalna wartość μ_m (d^{-1}),

K_d = właściwa szybkość rozpadu czynnych części stałych (d^{-1}),

ϑ_s = średni czas retencji osadu, CRO (d).

Zbadanie tego równania prowadzi do następujących wniosków:

- (i) Stężenie w odpływie jest niezależne od stężenia we wcieku (S_0); dlatego też wartość procentowa biodegradacji zmienia się wraz ze zmianą stężenia we wcieku, S_0 .

- (ii) Jedynym parametrem kontroli instalacji mającym wpływ na S_1 jest czas retencji osadu, ϑ_s .

- (iii) Przy danym stężeniu we wcieku, S_0 , wystąpi krytyczny czas retencji osadu, taki że:

$$\text{gdzie:} \quad \frac{1}{\vartheta_{SC}} = \frac{\mu_s \cdot S_0}{K_s + S_0} - K_d \quad [3]$$

ϑ_{SC} = krytyczny czas retencji osadu, poniżej którego właściwe mikroorganizmy będą wypłukiwane z instalacji.

- (iv) Ponieważ inne parametry równania (2) są powiązane z kinetyką wzrostu, temperatura może mieć wpływ na poziom substratu w odpływie i krytyczny wiek osadu, tzn. czas retencji osadu potrzebny do otrzymania określonego poziomu oczyszczania wzrośnie wraz ze spadkiem temperatury.

2. Przy bilansie masy części stałych w układzie naczyń porowatych i zakładając, że stężenie części stałych w odpływie z instalacji, X_2 , jest niskie w porównaniu ze stężeniem w naczyniu napowietrzającym, X_1 , czas retencji osadu wynosi:

$$\text{oraz} \quad \vartheta_s = \frac{V \cdot X_1}{(Q_0 - Q_1) \cdot X_2 + Q_1 \cdot X_1} \quad [4]$$

gdzie:

V = objętość naczynia napowietrzającego (l),

X_1 = stężenie części stałych w naczyniu napowietrzającym (mg/l),

X_2 = stężenie części stałych w odpływie, (mg/l),

Q_0 = natężenie przepływu wcieku (l/d),

Q_1 = natężenie przepływu osadu odpadowego (l/d).

Dlatego też możliwe jest kontrolowanie czasu retencji osadu przy dowolnej wstępnie wybranej wartości poprzez kontrolę natężenia przepływu osadu odpadowego, Q_1 .

Wnioski

- Głównym celem badania jest przewidywanie stężenia odpływu, a dzięki temu poziomowi badanej substancji chemicznej w odbiornikach wodnych.
- Dzięki wykreśleniu S_1 względem ϑ_s możliwe jest czasem szybkie oszacowanie krytycznego czasu retencji osadu ϑ_{sC} , np. krzywa 3 na rysunku 1. Jeśli nie jest to możliwe, można obliczyć ϑ_{sC} , wraz z przybliżonymi wartościami μ_m i K_s , dzięki wykreśleniu S_1 względem $S_1 \cdot \vartheta_s$.

Przekształcenie równania (1) daje

$$\frac{S_1 \cdot \vartheta_s}{1 + \vartheta_s \cdot K_d} = \frac{K_s}{\mu_m} + \frac{S_1}{\mu_m} \quad [5]$$

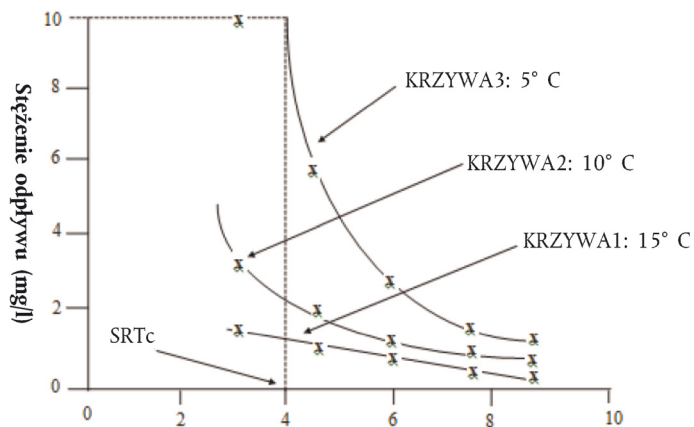
Jeśli K_d jest małe, wówczas $1 + \vartheta_s \cdot K_d \sim 1$ i [5] staje się:

$$S_1 \cdot \vartheta_s = \frac{K_s}{\mu_m} + \frac{S_1}{\mu_m} \quad [6]$$

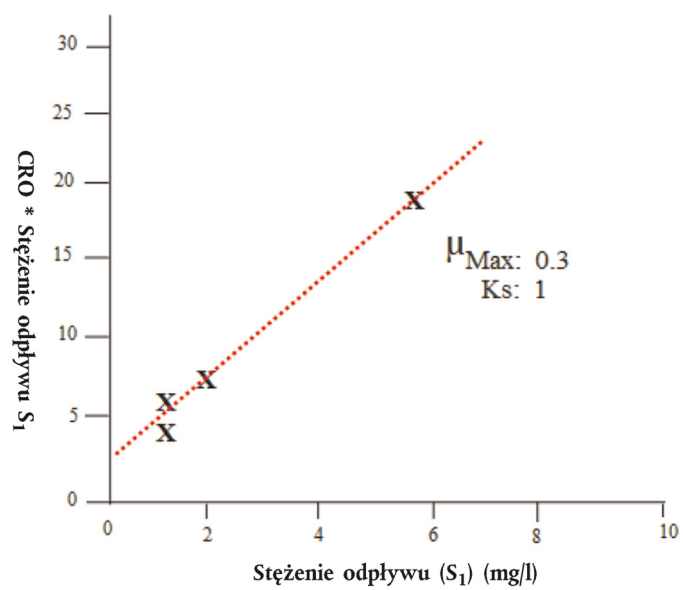
Stąd też wykres powinien być linią prostą (zob. rysunek 2) o nachyleniu $1/\mu_m$ i punkcie przecięcia K_s/μ_m ; tak więc $\vartheta_s \sim 1/\mu_m$.

Rysunek 1

Trzy temperatury; pięć CRO



Rysunek 2

Linia regresji $CRO \cdot S_1$ vs S_1 przy $T = 5^\circ\text{C}$ 

Glosariusz:
Stężenie odpływu
Krzywa

Dodatek 7

BADANIE PRZY NISKIM ($\mu\text{g/l}$) ZAKRESIE STĘŻEŃ

1. Wiele substancji chemicznych obecnych jest normalnie w środowisku wodnym, nawet w ściekach, w bardzo niskich stężeniach (rzędu $\mu\text{g/l}$). Przy takich stężeniach raczej nie odgrywają one roli podstawowych substratów wzrostowych – bardziej prawdopodobne jest, że ulegną degradacji jako substraty niewzrostowe, drugorzędne, równoległe wobec różnorodnych naturalnie występujących substancji chemicznych zawierających węgiel. Dlatego też degradacja takich substancji chemicznych nie będzie odpowiadała modelowi opisanemu w dodatku 6. Istnieje wiele modeli, które można zastosować, a w warunkach występujących powszechnie w oczyszczalniach ścieków jednocześnie może działać ich kilka. Do wyjaśnienia tego zagadnienia potrzeba znacznie więcej badań.
2. Tymczasem można stosować procedurę podaną w głównym tekście (rozdział C.10 A), ale tylko do biodegradowalności pierwotnej, wykorzystując odpowiednio niskie stężenia ($< 100 \mu\text{g/l}$) oraz zwalidowaną procedurę analityczną. Wartość procentową biodegradacji można obliczyć (zob. pkt 54 metody badawczej) pod warunkiem że uwzględni się procesy abiotyczne (adsorpcję, lotność itp.). Przykładem jest tu badanie przeprowadzone przez Nyholma i jego współpracowników (1) (2), w którym wykorzystano 4-godzinny cykl w systemie sekwencyjnego reaktora biologicznego. Poinformowali oni o uzyskaniu stałych szybkości reakcji pseudopierwszego rzędu w odniesieniu do 5 substancji chemicznych dodanych do ścieków syntetycznych w stężeniu między 5 a $100 \mu\text{g/l}$. (W odniesieniu do biodegradowalności ostatecznej można zastosować badane substancje chemiczne znakowane izotopem ^{14}C . Opis tego procesu wychodzi poza zakres niniejszej metody badawczej, ponieważ nie istnieją jeszcze żadne ustalone procedury, choć metoda zaproponowana dla ISO 14592 (3) zawiera wskazówki co do stosowania substancji chemicznych znakowanych izotopem ^{14}C).

Badanie SCAS

3. Później zaproponowano prostsze badanie dwuetapowe (4) (5) (6); po realizacji metody półciąglęgo osadu czynnego (SCAS) następują krótkie badania kinetyczne próbek pobranych z zestawów SCAS. Układ SCAS działa przy znanych współczynnikach ubytku osadu (w przeciwieństwie do pierwotnej metody badawczej C.12) i wykorzystuje zmodyfikowane ścieki syntetyczne OECD lub ścieki domowe. Ścieki syntetyczne zostały zmodyfikowane (z powodu zmiennej wartości pH oraz słabej sedimentacji osadu) poprzez dodanie fosforanu jako bufora, wyciągu z drożdży, chlorku żelaza(III) i soli pierwiastków śladowych, a ich ChZT zwiększono do ok. 750 mg/l dzięki podniesieniu stężenia peptonu i ekstraktu mięsa. Zestawy działały w cyklu 24-godzinnym: napowietrzanie przez 23 h, ubytek osadu, sedimentacja, usuwanie supernatantu (odpływu) i dodanie ścieków syntetycznych z badaną substancją chemiczną, do $100 \mu\text{g/l}$ (tzn. mniej więcej w tym samym stężeniu co stosowane w badaniu krótkoterminowym). Raz w tygodniu 10 % całości osadu wymieniano na świeży osad w celu utrzymania równowagi populacji bakterii.
4. Dokonuje się pomiarów stężeń badanej substancji chemicznej na początku i końcu napowietrzania, a badanie prowadzi się do momentu, kiedy osiągnięte zostanie stały poziom usuwania badanej substancji chemicznej; zajmuje to od jednego tygodnia do kilku miesięcy.

Badanie krótkoterminowe

5. Badanie krótkoterminowe (trwające ok. 8 godzin) stosuje się w celu określenia stałej szybkości reakcji (pseudo)pierwszego rzędu w odniesieniu do rozpadu badanej substancji chemicznej w osadzie czynnym o znanym, ale różnym pochodzeniu i historii. Próbkę osadu pobierane są w szczególności z reaktorów SCAS – na koniec okresu napowietrzania, kiedy stężenie substratu organicznego jest niskie – w trakcie trwania eksperymentu aklimatyzacji (pkt 3, 4). Dla porównania osad może być również pobierany z równoległego zestawu SCAS bez badanej substancji chemicznej. Mieszaniny osadu i badanej substancji chemicznej dodawane w co najmniej dwóch stężeniach w zakresie $1\text{--}50 \mu\text{g/l}$ są napowietrzane, bez dodatku ścieków syntetycznych czy innych substratów organicznych. Badana substancja chemiczna pozostająca w roztworze jest oznaczana w regularnych, np. godzinnych, odstępach w oparciu o degradowalność substancji chemicznej, przez okres nie dłuższy niż 24 h. Przed właściwą analizą próbki są odwirowywane.

Obliczenia

6. Dane z zestawów SCAS są wykorzystywane do obliczenia wartości procentowej usunięcia (pkt 54). Tak więc średnią stałą szybkości reakcji, K_1 (normalizowaną w odniesieniu do stężeń zawiesin) można obliczyć z:

$$K_1 = 1/t \cdot \ln \frac{C_e}{C_i} \cdot 1/SS(1/\text{g h})$$

gdzie:

t = czas napowietrzania (23 h),

C_e = stężenie pod koniec etapu napowietrzania ($\mu\text{g/l}$),

C_i = stężenie na początku etapu napowietrzania ($\mu\text{g/l}$),

SS = stężenie fazy stałej osadu czynnego (g/l).

7. W badaniu krótkoterminowym $\log \%$ pozostałego stężenia jest wykreślany względem czasu, a nachylenie wstępnej części ($10\text{--}50\%$ degradacji) wykresu jest równoważne K_1 , stałej szybkości reakcji (pseudo)pierwszego rzędu. Stała jest normalizowana w odniesieniu do stężenia fazy stałej osadu poprzez podzielenie nachylenia przez stężenie fazy stałej. Podawany wynik musi również obejmować szczegółowe informacje na temat wstępnego stężenia badanej substancji chemicznej i zawiesin, czasu retencji osadu, podawania i źródła osadu, a także szczegółowe informacje o wstępnym narażeniu na działanie badanej substancji chemicznej (o ile takie narażenie miało miejsce).

Zmienność wyników

8. Zmienność i inne aspekty kinetyki biodegradacji omawiano podczas ostatniego warsztatu SETAC (7). Dzięki takim badaniom, przeprowadzonym i planowanym, niedługo możliwe będzie lepsze zrozumienie kinetyki w oczyszczalniach ścieków, co umożliwi lepszą interpretację istniejących badań oraz zasugeruje lepsze rozwiązania w przyszłych metodach badawczych.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Nyholm N, Jacobsen BN, Pedersen BM, Poulsen O, Dambourg A i Schultz B (1992). Removal of micropollutants in laboratory activated sludge reactors. *Biodegradability*. *Wat. Res.* 26: 339–353.
- (2) Jacobsen BN, Nyholm N, Pedersen BM, Poulsen O, i Ostfeldt P (1993). Removal of organic micropollutants in laboratory activated sludge reactors under various operating conditions: Sorption. *Wat. Res.* 27: 1505–1510.
- (3) ISO 14592 (ISO/TC 147/SC5/WG4, N264) (1998). Water Quality – Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds at low concentrations in water.
- (4) Nyholm N, Ingerslev F, Berg UT, Pedersen JP i Frimer-Larsen H (1996). Estimation of kinetic rate constants for biodegradation of chemicals in activated sludge waste water treatment plants using short-term batch experiments and µg/l range spiked concentrations *Chemosphere* 33 (5): 851–864.
- (5) Berg UT i Nyholm N (1996). Biodegradability simulation Studies in semi-continuous activated sludge reactors with low (µg/l range) and standard (ppm range) chemical concentrations. *Chemosphere* 33 (4): 711–735.
- (6) Agencja Ochrony Środowiska Danii. (1996). Activated sludge biodegradability simulation test. Environmental Project, No. 337. Nyholm, N. Berg, UT. Ingerslev, F. Ministerstwo Środowiska i Energii, Kopenhaga.
- (7) Biodegradation kinetics: Generation and use of data for regulatory decision making (1997). Warsztat w Port Sunlight, UK. [red.] Hales SG, Feitjel T, King H, Fox K, i Verstraete W. 4–6.9.1996. SETAC-Europa, Bruksela.

C.10-B: Biofilmy

WPROWADZENIE

1. Badania symulacyjne zwykle stosuje się w przypadku chemikaliów, które nie przeszły badania przesiewowego szybkiej biodegradowalności (rozdział C.4 A do F niniejszego załącznika (9)), przeszły natomiast z powodzeniem badanie potencjalnej biodegradowalności. W drodze wyjątku badania symulacyjne stosuje się także do każdej substancji chemicznej, o której trzeba uzyskać więcej informacji, zwłaszcza chemikaliów o dużej wielkości obrotu. Wówczas zwykle stosuje się badanie osadu czynnego (C.10 A). W niektórych okolicznościach niezbędne są jednak konkretne informacje dotyczące zachowania substancji chemicznej w odpowiedzi na zastosowanie metod oczyszczania ścieków wykorzystujących biofilmy czyli złóż zraszanych, obrotowych filtrów biologicznych, złóż fluidalnych. Aby spełnić to zapotrzebowanie, opracowano różne urządzenia.
2. Gerike *et al.* (1) w ramach projektów pilotażowych zastosowali na dużą skalę złoża zraszane, stosowane w trybie zespolonym. Złoża te zajmowały dużo miejsca i wymagały stosunkowo dużych objętości ścieków lub ścieków syntetycznych. Truesdale *et al.* (2) opisali mniejsze złoża (ok. 1,8 m × 15 cm średnicy), które zasilano ściekami naturalnymi wolnymi od środków powierzchniowo czynnych, wymagające wciąż raczej dużych objętości ścieków. Aż 14 tygodni zajął rozwój »dojrzałego« biofilmu, a po pierwszym wprowadzeniu poddanego badaniu środka powierzchniowo czynnego potrzeba było kolejnych 4-8 tygodni, by nastąpiło przystosowanie.
3. Baumann *et al.* (3) zaprojektowali znacznie mniejsze złożo, w którym wykorzystali »wełnę« poliestrową zanurzoną uprzednio w osadzie czynnym jako chemicznie obojętną pożywkę wspomagającą biofilm. Substancja badana została zastosowana jako wyłączne źródło węgla, a biodegradowalność oceniano na podstawie pomiarów rozpuszczonego węgla organicznego (DOC) we wcieku i odpływie oraz ilości CO₂ w gazie uchodzącym.
4. Gloyna *et al.* (4) zastosowali całkowicie inną metodę w wynalezionym przez nich obrotowym reaktorze rurowym. Na wewnętrznej powierzchni obracającej się rury, nachylonej pod niewielkim kątem w stosunku do poziomu, na znanej części powierzchni wywołano przyrost biofilmu poprzez przepływ wcieku wprowadzanego do rury od strony uniesionego końca. Reaktor stosowano do badania biodegradowalności środków powierzchniowo czynnych (5), a także do badania optymalnej grubości biofilmu i rozproszenia przez biofilm (6). Wyżej wymienieni autorzy udoskonali projekt reaktora, wprowadzając do niego zmianę, dzięki której można ustalić zawartość CO₂ w gazie uchodzącym.

5. Obrotowy reaktor rurowy został przyjęty przez Stały Komitet Analityków (w Zjednoczonym Królestwie) jako standardowa metoda oceny zarówno biodegradowalności chemikaliów (7), jak i możliwości oczyszczenia ścieków oraz ich toksyczności (8). Opisana tu metoda ma liczne zalety, w tym: prostotę, niewielki rozmiar, odtwarzalność oraz zapotrzebowanie na stosunkowo niewielkie ilości pożywki organicznej.

ZASADA BADANIA

6. Na wewnętrzną powierzchnię wolno obracającej się nachylonej rury podaje się ścieki domowe lub syntetyczne oraz badaną substancję chemiczną, zawartą w mieszaninie lub osobno. Na wewnętrznej powierzchni rury tworzy się warstewka drobnoustrojów podobnych do tych występujących w biofiltrach. Warunki działania reaktora doбира się pod kątem odpowiedniej eliminacji materii organicznej oraz, w miarę potrzeby, utleniania amoniaku.
7. Odpływ z rury jest zbierany i osadzany albo filtrowany przed analizą pod kątem rozpuszczonego węgla organicznego (DOC) lub badanej substancji chemicznej określoną metodą. Zestawy kontrolne nieotrzymujące badanej substancji chemicznej działają równolegle w tych samych warunkach dla celów porównania. Przyjmuje się, że różnica pomiędzy stężeniami DOC w odpływach z zestawów badawczych i zestawów kontrolnych wynika z działania badanej substancji chemicznej lub jej organicznych metabolitów. Różnicę tę porównuje się ze stężeniem we wcieku wprowadzonej badanej substancji chemicznej (na podstawie DOC) w celu obliczenia poziomu eliminacji badanej substancji chemicznej.
8. Biodegradację można przeważnie odróżnić od bioadsorpcji przez staranne badanie krzywej czasu eliminacji. Potwierdzenie uzyskać można zazwyczaj poprzez zastosowanie badania szybkiej biodegradacji (pobór tlenu lub wytwarzanie dwutlenku węgla) z użyciem aklimatyzowanego inokulum pobranego na końcu badania z reaktorów otrzymujących badaną substancję chemiczną.

INFORMACJE NA TEMAT BADANEJ SUBSTANCJI CHEMICZNEJ

9. Właściwości badanej substancji chemicznej związane z czystością, rozpuszczalnością w wodzie, lotnością i adsorpcją powinny być znane, tak aby możliwa była prawidłowa interpretacja wyników.
10. Zwykle nie jest możliwe badanie lotnych ani słabro zpuszczalnych chemikaliów, chyba że podjęte zostaną szczególnie środki ostrożności (zob. dodatek 5 do rozdziału C.10 A). Należy również znać strukturę chemiczną, a przynajmniej wzór empiryczny, tak aby można było obliczyć wartości teoretyczne lub sprawdzić zmierzone wartości parametrów, np. teoretyczne zapotrzebowanie na tlen (TZT) czy zawartość rozpuszczonego węgla organicznego (DOC).
11. Informacje na temat toksyczności badanej substancji chemicznej dla mikroorganizmów (zob. dodatek 4 do rozdziału C.10 A) mogą być bardzo użyteczne przy wyborze odpowiednich stężeń do badania i mogą być niezbędne dla prawidłowej interpretacji niskich wartości biodegradacji.

POZIOMY PROGOWE

12. Początkowo wymagano, by biodegradacja pierwotna środków powierzchniowo czynnych dochodziła do 80 % lub więcej, nim substancja chemiczna mogła zostać wprowadzona do obrotu. Jeśli poziom 80 % nie zostanie osiągnięty, można zastosować badanie symulacyjne (potwierdzające), a środek powierzchniowo czynny można wprowadzić na rynek wyłącznie, jeśli ponad 90 % danej substancji chemicznej zostanie usunięte. Ogólnie w przypadku substancji chemicznych nie mówi się o przejściu z powodzeniem/bez powodzenia badania, a uzyskana wartość procentowa usunięcia może zostać wykorzystana w aproksymacji prawdopodobnego stężenia w środowisku stosowanej przy ocenach zagrożenia stwarzanego przez substancje chemiczne. W wielu badaniach czystych substancji chemicznych w przypadku ponad trzech czwartych substancji stwierdzono wartość procentową usunięcia DOC na poziomie > 90 %, a dla ponad 90 % substancji chemicznych, które wykazywały jakikolwiek znaczący poziom biodegradowalności, wartość ta wynosiła > 80 %.

SUBSTANCJE ODNIESIENIA

13. Dla prawidłowego przeprowadzenia procedury doświadczalnej warto od czasu do czasu, wraz z substancjami badanymi, testować substancje odniesienia, których zachowanie jest znane. Substancje takie to na przykład kwas adypinowy, 2-fenylofenol, 1-naftol, kwas 2,2'-bifenylodikarboksylowy, kwas 1-naftalenokarboksylowy.

ODTWARZALNOŚĆ WYNIKÓW BADAŃ

14. W laboratorium w Wielkiej Brytanii stwierdzono, że względne odchylenie standardowe w badaniach wynosiło 3,5 %, a między badaniami 5 % (7).

OPIS METODY

Przyrząd

Obrotowe reaktory rurowe

15. Przyrząd (zob. rysunki 1 i 2 w dodatku 8) składa się z baterii rur akrylowych o długości 30,5 cm każda i o średnicy wewnętrznej 5 cm, opartych na kołach o gumowanych brzegach, umieszczonych w metalowej oprawie. Każda rura posiada kołnierz zewnętrzny o szerokości ok. 0,5 cm do podtrzymania jej na kołach, jej

powierzchnia wewnętrzna jest zarysowana przy użyciu druciaka, od strony uniesionego końca (służącego do podawania materiału doprowadzanego) rura wyposażona jest w głęboki na 0,5 cm kołnierz wewnętrzny, służący do przytrzymania cieczy. Rury nachylone są pod kątem około jednego stopnia w stosunku do poziomu, aby uzyskać czas potrzebny na kontakt ze stosowaną w badaniu pożywką, wprowadzaną do czystej rury. Gumowane koła obracają się napędzane silnikiem o powolnych obrotach zmiennej prędkości. Temperatura rur kontrolowana jest przez ich instalację w pomieszczeniu o stałej temperaturze.

16. Dzięki zamknięciu każdego reaktora rurowego w nieco większej zamkniętej rurze i uszczelnienie połączeń przeciw wyciekom gazu, uchodzący gaz CO₂ można było zebrać w roztworze alkalicznym w celu jego dalszego pomiaru (6).
17. Dobowy zapas pożywki organicznej, w stosownych przypadkach z dodatkiem badanej substancji chemicznej, przeznaczonej do podawania do każdej rury, umieszczono w 20-litrowym zbiorniku magazynującym (A) (zob. rysunek 2). W miarę potrzeby roztwór badanej substancji chemicznej może być dawkowany osobno. Przy dnie każdego zbiornika magazynującego znajduje się ujście, które jest podłączone przez odpowiednie złączki, np. wykonane z gumy silikonowej, przez pompę perystaltyczną (B), do szklanej lub akrylowej rury doprowadzającej, która wprowadzona jest na głębokość 2–4 cm do uniesionego końca nachylonej rury (służącego do podawania materiału doprowadzanego) (C). Pozwala się, by odpływ skapywał ze znajdującego się niżej końca nachylonej rury do innego zbiornika magazynującego (D). Odpływ jest osadzany lub filtrowany przed analizą.

Przyrząd do filtrowania lub wirówka

18. Urządzenie do filtrowania próbek z filtrami membranowymi o odpowiedniej porowatności (nominalna średnica otworu 0,45 µm), które adsorbują organiczne substancje chemiczne i uwalniają węgiel organiczny w minimalnym stopniu. W przypadku stosowania filtrów uwalniających węgiel organiczny należy zmyć filtry dokładnie gorącą wodą w celu usunięcia wymywalnego węgla organicznego. Alternatywnie można zastosować wirówkę mogącą osiągnąć 40 000 m/s².
19. Sprzęt do wykonywania analiz służący do oznaczenia:

- zawartości rozpuszczonego węgla organicznego (DOC), całkowitego węgla organicznego (TOC) lub chemicznego zapotrzebowania na tlen (ChZT),
- konkretnej substancji chemicznej (metodą HPLC, GC itp.), o ile jest to konieczne,
- pH, temperatury, kwasowości, zasadowości,
- amonu, azotynu i azotanu, jeśli badanie przeprowadzane jest w warunkach nityfikacyjnych.

Woda

20. Woda wodociągowa, zawierająca mniej niż 3 mg/l DOC.
21. Woda destylowana lub dejonizowana, zawierająca mniej niż 2 mg/l DOC.

Pożywka organiczna

22. Jako pożywkę organiczną można stosować ścieki syntetyczne, ścieki domowe lub mieszaninę obydwu ich rodzajów. Wykazano, że zastosowanie wyłącznie ścieków domowych często skutkuje zwiększonym odsetkiem usuniętego DOC (w zestawach osadu czynnego), a nawet umożliwia biodegradację niektórych substancji chemicznych, które nie ulegają biodegradacji w przypadku zastosowania syntetycznych ścieków OECD. Dlatego też zaleca się stosowanie ścieków domowych. Należy zmierzyć stężenie DOC lub ChZT w każdej nowej partii pożywki organicznej. Kwasowość lub zasadowość pożywki organicznej powinna być znana. Pożywka może wymagać dodania odpowiedniego bufora (wodorowęglanu sodu lub wodorofosforanu potasu), jeżeli jej poziom kwasowości lub zasadowości jest niski, w celu utrzymania pH w reaktorze w trakcie badania na poziomie ok. 7,5 ± 0,5. Ilość dodawanego bufora oraz moment jego dodania należy określić indywidualnie dla każdego przypadku.

Ścieki syntetyczne

23. Rozpuścić w każdym litrze wody wodociągowej: pepton, 160 mg; ekstrakt mięsa, 110 mg; mocznik, 30 mg; fosforan dwupotasowy bezwodny (K₂HPO₄), 28 mg; chlorek sodu (NaCl), 7 mg; chlorek wapnia dwuwodny (CaCl₂·2H₂O), 4 mg; siarczan magnezu siedmiowodny (Mg₂SO₄·7H₂O), 2 mg. Ten ściek syntetyczny OECD stanowi przykład i daje średnie stężenie DOC we wcieku na poziomie ok. 100 mg/l. Alternatywnie można wykorzystać inne składniki o zbliżonym stężeniu DOC, które bardziej odpowiadają prawdziwym ściekom. Taki ściek syntetyczny można przygotować w wodzie destylowanej w postaci skoncentrowanej i przechowywać w temperaturze ok. 1 °C przez maksymalnie jeden tydzień. W razie potrzeby należy go rozcieńczyć wodą wodociągową. (Ta pożywka nie jest satysfakcjonująca, np. stężenie azotu jest bardzo wysokie, a zawartość węgla dość niska, ale nie zaproponowano niczego lepszego poza ewentualnym dodaniem większej ilości fosforanu jako bufora i dodatkowego peptonu).

Ścieki domowe

24. Wykorzystać świeżo osadzone ścieki zbierane codziennie z oczyszczalni ścieków przyjmującej głównie ścieki domowe. Ścieki powinny być zbierane przed wstępną sedymentacją z przelewu wstępnego osadnika lub z materiału doprowadzanego do instalacji osadu czynnego i zasadniczo nie powinny zawierać cząstek gruboziarnistych. Ścieki można stosować po przechowywaniu ich przez kilka dni w temperaturze ok. 4 °C, po sprawdzeniu, czy poziom DOC (lub ChZT) nie zmniejszył się znacząco (tzn. o mniej niż 20 %) w trakcie przechowywania. Aby zmniejszyć zakłócenia w układzie, przed zastosowaniem należy skorygować DOC (lub ChZT) każdej nowej partii do odpowiedniej stałej wartości, np. poprzez rozcieńczenie wodą wodociągową.

Środek smarny

25. Do smarowania rolek pompy perystaltycznej można stosować glicerynę lub oliwę z oliwek. Obie substancje nadają się do użycia na rurkach z gumy silikonowej.

Roztwory podstawowe badanej substancji chemicznej

26. W przypadku substancji chemicznych o odpowiedniej rozpuszczalności przygotować roztwory podstawowe o właściwych stężeniach (np. 1 do 5 g/l) w wodzie dejonizowanej lub w części mineralnej ścieków syntetycznych. W przypadku nierozpuszczalnych substancji chemicznych, zob. dodatek 5 rozdziału C.10-A. Bez wprowadzenia modyfikacji do reaktorów rurowych (zob. pkt 16) metoda ta nie nadaje się do lotnych substancji chemicznych. Oznaczyć DOC i całkowity węgiel organiczny (TOC) roztworu podstawowego i powtórzyć pomiary przy każdej nowej partii. Jeśli różnica pomiędzy DOC a TOC jest większa niż 20 %, sprawdzić rozpuszczalność badanej substancji chemicznej w wodzie. Porównać DOC lub stężenie badanej substancji chemicznej, mierzone z użyciem swoistej metody analitycznej w roztworze podstawowym z wartością nominalną w celu stwierdzenia, czy odzysk jest wystarczający (zwykle można spodziewać się wartości > 90 %). Sprawdzić, w szczególności w przypadku dyspersji, czy można wykorzystać DOC jako parametr analityczny, czy też możliwe jest wyłącznie zastosowanie techniki analitycznej swoistej dla badanej substancji chemicznej. W przypadku dyspersji konieczne jest odwirowanie próbek. W każdej nowej partii zmierzyć DOC, ChZT lub badaną substancję chemiczną przy użyciu swoistej metody analitycznej.
27. Określić pH roztworu podstawowego. Wartości krańcowe wskazują, że dodanie substancji chemicznej może mieć wpływ na pH osadu czynnego w układzie badawczym. W takim przypadku w celu uzyskania pH o wartości $7 \pm 0,5$ należy zneutralizować roztwór podstawowy, dodając niewielkie ilości kwasu nieorganicznego lub zasady, ale unikając strącania badanej substancji chemicznej.

PROCEDURA

Przygotowanie pożywki organicznej do dozowania

28. Na początku i w trakcie trwania badania dopilnować, by pojemniki na wciek i odpływ oraz rury prowadzące ze zbiorników na wciek i do zbiorników na odpływ były dokładnie oczyszczone, aby usunąć przyrost mikroorganizmów.
29. Codziennie przygotować świeże ścieki syntetyczne (pkt 23) z substancji stałych lub ze skoncentrowanego roztworu podstawowego przez odpowiednie rozcieńczanie wodą wodociągową. Mierzyć potrzebną ilość w cylindrze i dodawać do czystego zbiornika na wciek. Do ścieków syntetycznych przed rozcieńczeniem należy także, w miarę potrzeb, dodać konieczną ilość roztworu podstawowego badanej substancji chemicznej lub substancji odniesienia. W przypadku gdy jest to wygodniejsze lub niezbędne dla uniknięcia strat badanej substancji chemicznej, przygotować oddzielny rozcieńczony roztwór badanej substancji chemicznej w osobnym zbiorniku i doprowadzać go do nachylonych rur za pośrednictwem innej pompy dozującej.
30. Alternatywnie, w miarę możliwości, należy stosować osadzone ścieki domowe (pkt 24) zbierane, o ile to możliwe, codziennie.

Praca obrotowych reaktorów rurowych

31. Do oceny jednej badanej substancji chemicznej potrzebne są dwa identyczne reaktory rurowe, instalowane w pomieszczeniu o stałej temperaturze zwykle 22 ± 2 °C.
32. Pompy perystaltyczne nastawić na podawanie do nachylonych rur, obracających się z prędkością 18 ± 2 obr./min, pożywki organicznej w ilości 250 ± 25 ml/h (bez badanej substancji chemicznej). Do rur pompy stosować na początku oraz regularnie w trakcie badania środek smarny (pkt 25), aby zapewnić właściwe działanie i przedłużyć okres użytkowania rur.
33. Dostosować kąt nachylenia rur w stosunku do poziomu tak, by uzyskać czas przebywania materiału doprowadzanego w czystej rurze rzędu $125 \pm 12,5$ sek. Oszacować czas retencji przez dodanie do materiału doprowadzanego markera niebiologicznego (np. NaCl, chemicznie obojętnego barwnika): przyjmuje się, że czas, jaki zajmuje osiągnięcie najwyższego stężenia w odpływie, to średnia arytmetyczna czasu retencji (gdy występuje najgrubsza warstwa biofilmu, czas retencji może zwiększyć się do ok. 30 min).
34. Stwierdzono, że te współczynniki, prędkości i czasy dają odpowiedni poziom usuwania (> 80 %) DOC (lub ChZT) i wytwarzają nityfikowany odpływ. Jeśli poziom usuwania jest niewystarczający lub jeśli ma być symulowane działanie konkretnej oczyszczalni ścieków, należy zmienić współczynnik przepływu. W tym drugim przypadku, dostosować współczynnik dozowania pożywki organicznej do poziomu, przy jakim działanie reaktora odpowiada działaniu danej oczyszczalni ścieków.

Inokulacja

35. Gdy stosowane są ścieki syntetyczne, do zapoczątkowania rozwoju mikroorganizmów może być wystarczająca inokulacja drogą powietrzną, w innym przypadku należy do materiału doprowadzanego przez 3 dni dodawać 1 ml/l osadzonych ścieków.

Pomiary

36. Należy w regularnych odstępach czasu sprawdzać, czy dawki i prędkość obrotowa mieszczą się w wymaganych granicach. Należy także mierzyć pH w odpływie, w szczególności gdy spodziewana jest nityfikacja.

Pobieranie próbek i analiza

37. Metodę, schemat i częstotliwość pobierania próbek dobiera się tak, by były odpowiednie dla celu badania. Przykładowo należy pobrać jednorazową próbkę wcieku i odpływu lub pobierać próbki przez dłuższy okres np. 3–6 godzin. W pierwszym okresie, bez badanej substancji chemicznej, pobierać próbki dwa razy w tygodniu. Próbki należy przefiltrować przez membranę lub odwirować przy ok. 40 000 m/sek² przez około 15 min (pkt 18). Przed filtrowaniem przez membranę może być konieczne osadzenie lub przefiltrowanie próbek przez filtr dla cząstek grubych. Oznaczyć DOC (lub ChZT) co najmniej w duplikacie oraz w miarę konieczności biologiczne zapotrzebowanie na tlen (BZT), amon, azotyn i azotan.
38. Wszystkie analizy należy przeprowadzać jak najszybciej po zebraniu i przygotowaniu próbek. Jeśli analizy muszą zostać odroczone, próbki należy przechowywać w temperaturze ok. 4 °C w ciemności, w pełnych i szczelnie zamkniętych butelkach. Jeśli próbki muszą być przechowywane przez ponad 48 h, należy zabezpieczyć je przez głębokie mrożenie, zakwaszenie lub dodanie odpowiedniej substancji toksycznej (np. 20 ml/l roztworu chlorku rtęci(II) o stężeniu 10 g/l). Zadbac, by technika zabezpieczenia nie miała wpływu na wyniki analizy.

Okres rozruchu

39. W tym okresie biofilm na powierzchni przyrasta, by osiągnąć optymalną grubość, co zwykle zajmuje około 2 tygodnie i raczej nie przekracza 6 tygodni. Poziom usuniętego DOC (lub ChZT) rośnie (pkt 44) i osiąga wartość plateau. Gdy osiągnięte zostaje plateau o podobnej wartości w obu rurach, jedna wybierana jest jako próbka kontrolna na pozostały czas badania, w którym ich działanie powinno pozostawać zbliżone.

Wprowadzenie badanej substancji chemicznej

40. Na tym etapie dodać badaną substancję chemiczną do drugiego reaktora w pożądanym stężeniu, zwykle 10–20 mg C/l. W próbie kontrolnej podaje się nadal samą pożywkę organiczną.

Okres przystosowania

41. Kontynuować dokonywanie analiz DOC (lub ChZT) dwa razy w tygodniu, a jeśli ma być oceniona biodegradowalność pierwotna, mierzyć także stężenie badanej substancji chemicznej z użyciem swoistej metody analitycznej. Po wprowadzeniu po raz pierwszy badanej substancji chemicznej należy przewidzieć okres od jednego do sześciu tygodni (lub dłużej w szczególnych warunkach) na przystosowanie. W przypadku gdy procent usunięcia badanej substancji (pkt 43-45) osiąga maksymalną wartość, należy uzyskać 12–15 ważnych wartości z fazy plateau przez okres około 3 tygodni w celu oceny średniej procentowej wartości usunięcia. Badanie uznaje się za ukończone, jeśli osiągnięty zostaje odpowiednio wysoki poziom eliminacji. Nie należy zwykle przekraczać 12 tygodni trwania badania po dodaniu badanej substancji chemicznej.

Usuwanie biofilmu

42. Względnie regularnie następuje nagłe usunięcie z rur, czy też złuszczenie się, nadmiaru filmu. W celu dopilnowania, by pozostało to bez wpływu na porównywalność wyników, należy przewidzieć co najmniej dwa pełne cykle przyrastania i złuszczenia się.

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ**Opracowanie wyników**

43. Obliczyć wartość procentową eliminacji DOC (lub ChZT) badanej substancji chemicznej w odniesieniu do każdej oceny w czasie, stosując równanie:

$$D_t = 100 [C_s - (E - E_0)]/C_s \%$$

gdzie:

D_t = procentowa eliminacja DOC (lub ChZT) w czasie t ,

C_s = stężenie DOC (lub ChZT) we wcieku w wyniku działania badanej substancji chemicznej, najlepiej oszacowane ze stężenia oraz dodanej objętości roztworu podstawowego (mg/l),

E = mierzona wartość DOC (lub ChZT) w badanym odpływie w czasie t (mg/l),

E_0 = mierzona wartość DOC (lub ChZT) w odpływie kontrolnym w czasie t (mg/l).

Obliczenia powtórzyć dla substancji odniesienia, jeśli jest badana.

Działanie reaktora kontrolnego

44. Stopień eliminacji (D_B) DOC (lub ChZT) pożywki organicznej w reaktorach kontrolnych stanowi przydatną informację przy ocenie biodegradującego działania biofilmu w trakcie badania. Obliczyć wartość procentową eliminacji z równania:

$$D_B = 100 (1 - E_0/C_m) \%$$

gdzie:

C_m = DOC (lub ChZT) pożywki organicznej we wcieku kontrolnym (mg/l).

45. Obliczyć usunięcie (D_{ST}) badanej substancji chemicznej, jeśli je mierzono, przy użyciu właściwej metody analitycznej przy każdej ocenie w czasie, z równania:

$$DST = 100 (1 - S_e/S_i) \%$$

gdzie:

S_i = mierzone lub, w miarę możliwości, szacowane stężenie badanej substancji chemicznej we wcieku badanym (mg/l),

S_e = mierzone stężenie badanej substancji chemicznej we wcieku kontrolnym w czasie t (mg/l).

Jeśli metoda analityczna daje pozytywną wartość w nieskorygowanym równoważniku ścieków do S_c mg/l, obliczyć wartość procentową usunięcia (D_{SC}) z:

$$DSC = 100 (S_i - S_e + S_c)/(S_i + S_c) \%$$

Prezentacja wyników badania

46. Przedstawić w postaci wykresu wartość procentową eliminacji D_t i D_{ST} (lub D_{SC}), jeśli jest dostępna, w stosunku do czasu (zob. dodatek 2 rozdziału C.10-A). Jako procentową wartość usunięcia badanej substancji chemicznej przyjmując średnią arytmetyczną (przedstawioną jako najbliższą liczbę całkowitą) i odchylenie standardowe 12-15 wartości dla D_T (oraz dla D_{ST} , jeśli jest dostępna) uzyskanych w fazie plateau. Z kształtu krzywej eliminacji można wysnuć wnioski dotyczące procesów usuwania.

Adsorpcja

47. Jeśli na początku badania obserwuje się wysoką eliminację DOC, badana substancja chemiczna jest prawdopodobnie eliminowana przez adsorpcję na biofilm. Możliwe jest udowodnienie tego poprzez oznaczenie adsorbowanej badanej substancji chemicznej w złuszczonych substancjach stałych biofilmu. Wysoki poziom eliminacji DOC adsorbowalnych substancji chemicznych podczas całego badania nie jest typowy; zazwyczaj na początku występuje wysoki poziom usuwania, który następnie spada do równomiernego poziomu. Jeśli jednak adsorbowana badana substancja chemiczna spowodowała przystosowanie populacji mikroorganizmów, eliminacja DOC badanej substancji chemicznej zwiększyłaby się w następstwie i osiągnęła wysoki poziom plateau.

Faza zastoju

48. Tak samo jak w przypadku statycznych badań przesiewowych, wiele badanych substancji chemicznych wymaga fazy zastoju przed wystąpieniem pełnej biodegradacji. W fazie zastoju następuje przystosowanie (lub adaptacja) bakterii odpowiadających za rozkład przy jednoczesnym prawie całkowitym braku usuwania badanej substancji chemicznej; następnie następuje wstępny przyrost tych bakterii. Zakłada się, że ta faza kończy się, a zaczyna faza degradacji, kiedy następuje usunięcie ok. 10 % wstępnej ilości badanej substancji chemicznej (po adsorpcji, o ile takowa wystąpi). Faza zastoju jest często bardzo zmienna i słabo odtwarzalna.

Faza plateau

49. Faza plateau na krzywej eliminacji w teście ciągłym definiowana jest jako ta faza, w której następuje największa degradacja. Faza plateau powinna trwać co najmniej 3 tygodnie i należy w jej trakcie dokonać około 12-15 ważnych pomiarów wartości.

Średni stopień eliminacji badanej substancji chemicznej

50. Obliczyć średnią wartość z wartości eliminacji D_t (oraz D_{st} , jeśli jest dostępna) badanej substancji chemicznej w fazie plateau. W zaokrągleniu do najbliższej liczby całkowitej (1 %) stanowi ona stopień eliminacji badanej substancji chemicznej. Zaleca się również obliczenie 95 % przedziału ufności średniej wartości. W podobny sposób obliczyć średni stopień eliminacji (D_B) pożywki organicznej w naczyniu kontrolnym.

Wskazanie biodegradacji

51. Jeśli badana substancja chemiczna nie adsorbuje w znaczącym stopniu na biofilmie, a krzywa eliminacji ma typowy kształt krzywej biodegradacji z fazami zastoju, degradacji i plateau (ust. 48, 49), zmierzoną eliminację można bezpiecznie przypisać do biodegradacji. Jeśli zaszło znaczne wstępne usuwanie, badanie symulacyjne nie pozwala na dokonanie rozróżnienia między procesami eliminacji biologicznej i abiotycznej. W takich przypadkach oraz w innych przypadkach, gdy występuje wątpliwość dotycząca biodegradacji (np. ma miejsce odpadanie biofilmu) należy zanalizować badaną substancję chemiczną w próbkach filmu lub przeprowadzić dodatkowe statyczne badania (przesiewowe) biodegradowalności w oparciu o parametry jasno wskazujące na procesy biologiczne. Takie badania to testy poboru tlenu (rozdział C.4 niniejszego załącznika D, E i F) (9) lub badanie, które mierzy wytwarzanie CO_2 (rozdział C.4-C niniejszego załącznika dotyczący metody pomiaru dwutlenku węgla w przestrzeni nad roztworem) (10); jako inokulum należy zastosować biofilm z odpowiedniego reaktora, uprzednio poddany działaniu badanej substancji chemicznej.
52. Jeśli zmierzono zarówno wartość usuwania DOC, jak i usuwania konkretnej substancji chemicznej, znaczące różnice (ta pierwsza niższa od tej drugiej) między usuniętymi wartościami procentowymi wskazują na obecność w odpływie produktów produktów organicznych, które mogą być trudne do rozłożenia i należy je zbadać.

Ważność wyników badania

53. Badanie należy uznać za ważne, jeśli stopień eliminacji DOC (lub ChZT) (D_B) w zestawach kontrolnych wynosi $> 80\%$ pod dwóch tygodniach działania i nie poczyniono obserwacji nietypowych.
54. Jeśli badano szybko biodegradowalną substancję chemiczną (odniesienia), stopień biodegradacji powinien wynosić $> 90\%$, a różnica między wartościami w duplikatach nie powinna wynosić więcej niż 5% . Jeśli te dwa kryteria nie są spełnione, dokonać przeglądu procedur doświadczalnych i pozyskać ścieki domowe z innego źródła.
55. Podobnie różnice między wartościami biodegradacji z zestawów stanowiących duplikaty (jeśli są stosowane), poddawanych działaniu badanej substancji chemicznej, nie powinny wynosić więcej niż 5% . Jeśli to kryterium nie jest spełnione, ale poziom usuwania jest wysoki, prowadzić analizę przez kolejne trzy tygodnie. Jeśli poziom usuwania jest niski, zbadać hamujący wpływ badanej substancji chemicznej, jeśli nie jest znany, i powtórzyć badanie przy niższym stężeniu badanej substancji chemicznej, jeśli to możliwe.

Sprawozdanie z badania

56. Sprawozdanie z badania musi zawierać co najmniej następujące informacje:

Badana substancja chemiczna

- dane identyfikacyjne,
- cechy fizyczne oraz w stosownych przypadkach właściwości fizykochemiczne.

Warunki badania

- wszelkie zmiany układu badawczego, zwłaszcza jeśli badane są nierozpuszczalne lub lotne substancje chemiczne,
- rodzaj pożywki organicznej,
- proporcja i charakter odpadów przemysłowych w ściekach, jeśli są wykorzystywane i znane,
- metoda inokulacji,
- zawartość DOC (rozpuszczonego węgla organicznego) i TOC (całkowitego węgla organicznego) w roztworze podstawowym badanej substancji chemicznej; sposób przygotowania, w przypadku zawiesiny; stosowane stężenia badanej substancji chemicznej, podać powody, jeśli wykraczają poza zakres $10\text{-}20\text{ mg/l}$ DOC; metoda podania; data pierwszego podania; wszelkie zmiany w stężeniu,

- średni hydrauliczny czas zatrzymania (przy braku przyrostu); prędkość obrotowa rury; w miarę możliwości przybliżony kąt nachylenia,
- szczegółowe informacje dotyczące złuszczenia się; czas i natężenie,
- temperatura badania i zakres,
- stosowane techniki analityczne.

Wyniki badania

- w stosownych przypadkach wszelkie dane z pomiarów DOC, ChZT, specyficzne analizy, pH, temperatura, substancje chemiczne N,
- dane z wycień D_t (lub D_{tc}), D_B, D_s uzyskane w postaci tabeli i krzywe eliminacji,
- informacje o fazach zastoju i plateau, czas trwania badania, stopień eliminacji badanej substancji chemicznej, substancji odniesienia (jeśli jest badana) i pożywki organicznej (w zestawie kontrolnym) wraz z danymi statystycznymi i stwierdzeniami dotyczącymi biodegradowalności i ważności badania,
- omówienie wyników.

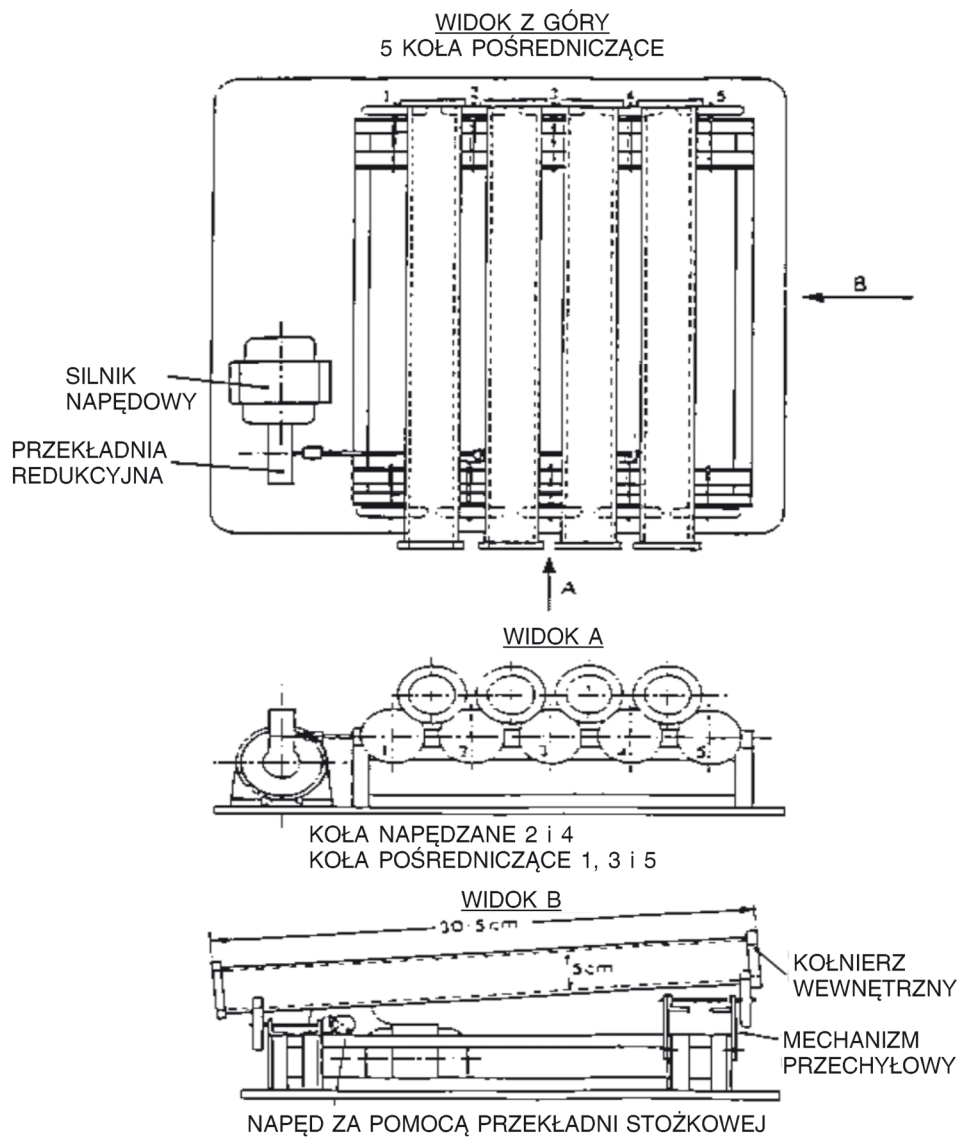
BIBLIOGRAFIA:

- (1) Gerike P, Fischer W, Holtmann W (1980). Biodegradability determinations in trickling filter units compared with the OECD Confirmatory Test. *Wat. Res.* 14: 753–758.
 - (2) Truesdale GA, Jones K, Vandyke KG (1959). Removal of synthetic detergents in sewage treatment processes: Trials of a new biologically attackable material. *Wat. Waste Tr. J.* 7: 441–444.
 - (3) Baumann U, Kuhn G and Benz M. (1998) Einfache Versuchsanordnung zur Gewinnung gewässerökologisch relevanter Daten, UWSF - Z. Umweltchem. Ökotox. 10: 214-220.
 - (4) Gloyna EF, Comstock RF, Renn CE (1952). Rotary tubes as experimental trickling filters. *Sewage ind. Waste* 24: 1355–1357.
 - (5) Kumke GW, Renn CE (1966). LAS removal across an institutional trickling filter. *JAOCs* 43: 92–94.
 - (6) Tomlinson TG, Snaddon DHM, (1966). Biological oxidation of sewage by films of micro-organisms. *Int. J. Air Wat. Pollut.* 10: 865–881.
 - (7) Her Majesty's Stationery Office (1982). Methods for the examination of waters and associated materials. Assessment of biodegradability, 1981, Londyn.
 - (8) Her Majesty's Stationery Office (1984). Methods for the examination of waters and associated materials. Methods for assessing the treatability of chemicals and industrial waste waters and their toxicity to sewage treatment processes, 1982, Londyn.
 - (9) Rozdział C.4 niniejszego załącznika: Oznaczanie szybkiej biodegradowalności A–F.
 - (10) ISO 14593 (1998). Water Quality-Evaluation in an aqueous medium of the ultimate biodegradability of organic substances. Method by analysis of released inorganic carbon in sealed vessels.
-

Dodatek 8

Rysunek 1

Rury obrotowe



Glosariusz:

Widok z góry:

Widok A/B

Koła napędzane

Koła pośredniczące

Silnik napędowy

Przekładnia redukcyjna

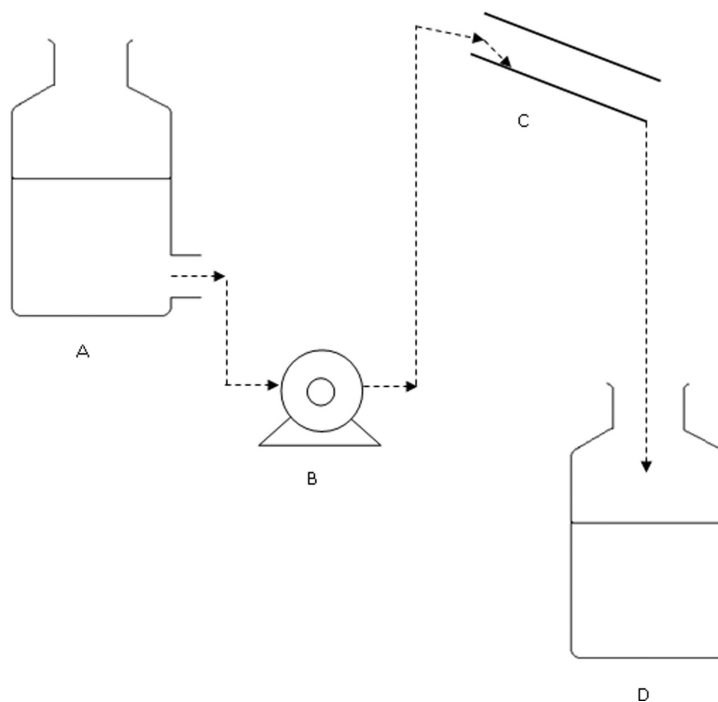
Kołnierz wewnętrzny

Mechanizm przechyłowy

Napęd za pomocą przekładni stożkowej

Rysunek 2

Schemat przepływu



A: Zbiornik materiału doprowadzanego

B: Pompa perystaltyczna

C: Rurka obrotowa

D: Naczynie do zbierania odpływu

DEFINICJE

Badana substancja chemiczna: jakakolwiek substancja lub mieszanina badana za pomocą niniejszej metody badawczej.

Chemikalia: »Należy zauważyć, że termin 'chemikalia' jest szeroko stosowany w porozumieniach UNCED i dokumentach powiązanych dla uwzględnienia substancji, produktów, mieszanin, preparatów i wszelkich innych terminów, które mogą być stosowane w istniejących systemach, by wskazać cały zakres«.

10) dodaje się rozdziały C.27, C.28, C.29 i C.30:

„C.27. BADANIE TOKSYCZNOŚCI W UKŁADZIE OSAD-WODA NA OCHOTKOWATYCH Z WYKORZYSTANIEM WZBOGACONEGO OSADU

WPROWADZENIE

1. Niniejsza metoda badawcza jest równoważna dotyczącej badań wytycznej OECD nr 218 (2004). Niniejszą metodę zaprojektowano, by ocenić skutki przedłużonego narażenia żyjących w osadach larw *Chironomus* sp., należących do rzędu słodkowodnych muchówek, na działanie chemikaliów. Metoda opiera się na protokołach badania toksyczności obowiązujących dla *Chironomus riparius* i *Chironomus tentans*, które opracowano w Europie (1) (2) (3) i Ameryce Płn. (4) (5) (6) (7) (8) i potwierdzono w badaniu międzylaboratoryjnym (1) (6) (9). Można także wykorzystywać inne dobrze udokumentowane gatunki ochotkowatych, np. *Chironomus yoshimatsui* (10) (11).
2. Scenariusz narażenia stosowany w tej metodzie badawczej polega na wzbogacaniu osadu substancją badaną. Wybór odpowiedniego scenariusza narażenia zależy od zamierzonego zastosowania badania. Scenariusz polegający na wzbogacaniu osadu ma na celu symulację utrzymywania się w osadzie podwyższonego stężenia chemikaliów. Ten układ narażenia obejmuje wzbogacanie osadu w układzie badawczym osad denny-woda.
3. Substancje, które należy przebadać pod kątem organizmów żyjących w osadach, zwykle pozostają w tym układzie przez długi czas. Organizmy żyjące w osadach mogą być narażane na działanie substancji kilkoma drogami. Względne znaczenie danej drogi narażenia i czas, jaki jest potrzebny, by przyczyniła się ona do ogólnych skutków toksycznych, zależy od fizykochemicznych właściwości danej substancji chemicznej. W przypadku substancji silnie adsorbujących (np. substancji o $\log K_{ow} > 5$) lub w przypadku substancji tworzących

wiązanie kowalencyjne z osadami, znaczącą drogą narażenia może być przyjmowanie zanieczyszczonego pokarmu. Aby zapobiec niedoszacowaniu toksyczności wysokolipofilowych substancji, można rozważyć zastosowanie pokarmu dodawanego do osadu przed wprowadzeniem substancji badanej. Aby uwzględnić wszelkie możliwe drogi narażenia, niniejsza metoda badawcza ukierunkowana jest na narażenie długoterminowe. Badanie trwa od 20 do 28 dni w przypadku *C. riparius* i *C. yoshimatsui*, a w przypadku *C. tentans* od 28 do 65 dni. Jeśli do określonego celu potrzebne są dane krótkoterminowe, na przykład w celu zbadania skutków działania substancji niestabilnych, po okresie dziesięciu dni można usunąć dodatkowe replikaty.

4. Mierzone punkty końcowe to całkowita liczba wylęgniętych dorosłych osobników i czas do wylęgu. Jeśli potrzebne są dodatkowe dane krótkoterminowe, zaleca się, by pomiarów przeżycia i wzrostu larw dokonywać po okresie dziesięciu dni, korzystając w stosownych przypadkach z dodatkowych replikatów.
5. Zalecane jest stosowanie osadów preparowanych. Osady preparowane są korzystniejsze od osadów naturalnych z kilku względów:
 - zmienność eksperymentalna jest ograniczona, ponieważ osad preparowany stanowi odtwarzalną »zestandaryzowaną matrycę«, tak że wyeliminowana zostaje potrzeba znalezienia źródeł niezanieczyszczonego i czystego osadu,
 - badania można rozpocząć w każdej chwili, unikając zmienności sezonowej badanego osadu i nie jest konieczna wstępna obróbka osadu w celu usunięcia rodzimej fauny; stosowanie osadu preparowanego zmniejsza także koszty związane ze zbieraniem w terenie dostatecznych ilości osadu na potrzeby rutynowych badań,
 - zastosowanie osadu preparowanego umożliwia porównanie toksyczności i stosowną klasyfikację substancji.
6. Definicje są zamieszczone w dodatku 1.

ZASADA METODY BADANIA

7. Larwy ochotkowatych w pierwszym stadium larwalnym poddawane są działaniu badanej substancji chemicznej o różnym stopniu stężenia w układach osad denny-woda. Osad wzbogaca się badaną substancją chemiczną, a następnie larwy w pierwszym stadium larwalnym wprowadza się do zlewek, w których ustabilizowano stężenia badanej substancji w osadzie i wodzie. Na końcu badania mierzy się współczynnik wylęgu i rozwoju ochotkowatych. W miarę potrzeby przeżycie i masa larw mogą być także mierzone po 10 dniach (z wykorzystaniem w stosownych przypadkach dodatkowych replikatów). Dane te analizowane są przy użyciu modelu regresyjnego w celu oszacowania stężenia, które spowodowałyby zmniejszenie wylęgu, przeżycia lub wzrostu larw o x % (np. EC₁₅, EC₅₀ itd.) albo przez badanie hipotezy statystycznej w celu określenia stężenia, przy którym nie obserwuje się szkodliwych zmian (NOEC) lub najniższego stężenia, przy którym obserwuje się szkodliwe zmiany (LOEC). To ostatnie wymaga porównania wartości zmian z wartościami kontrolnymi z użyciem badań statystycznych.

INFORMACJE NA TEMAT SUBSTANCJI BADANEJ

8. Należy znać rozpuszczalność substancji badanej w wodzie, prężność par, podział substancji w osadzie oraz jej stabilność w wodzie i osadzie, uzyskane w wyniku pomiarów lub obliczeń. Powinna być dostępna wiarygodna metoda analityczna do oznaczania ilościowego substancji badanej w osadzie, wodzie porowej i warstwie wody powyżej osadu ze znaną i udokumentowaną dokładnością oraz granicą wykrywalności. Użyteczne informacje obejmują wzór strukturalny i czystość substancji badanej. Do przydatnych informacji należą także dane dotyczące chemicznych losów substancji w środowisku (np. jej rozpraszanie, rozkład abiotyczny i biotyczny itd.). Dalsze wskazówki dotyczące badania substancji o własnościach fizykochemicznych utrudniających ich badanie podano w pozycji (12) w bibliografii.

SUBSTANCJE ODNIESIENIA

9. Substancje odniesienia mogą być okresowo badane dla zagwarantowania, że protokół i warunki badania są rzetelne. Przykłady substancji toksycznych stosowanych z powodzeniem w badaniach międzylaboratoryjnych i walidacyjnych: lindan, trifluralina, pentachlorofenol, chlorek kadmu i chlorek potasu (1) (2) (5) (6) (13).

WAŻNOŚĆ BADANIA

10. Aby badanie było ważne, obowiązują następujące warunki:
 - odsetek wylęgniętych osobników dorosłych w próbach kontrolnych musi na końcu badania być co najmniej na poziomie 70 % (1) (6),
 - w naczyniach zawierających próby kontrolne wylęg osobników dorosłych *C. riparius* i *C. yoshimatsui* z larw powinien nastąpić między 12. a 23. dniem od ich wprowadzenia do naczynia; w przypadku *C. tentans* niezbędny jest okres od 20 do 65 dni,

- na końcu badania należy zmierzyć wartość pH oraz stężenie rozpuszczonego tlenu w każdym naczyniu. Stężenie tlenu powinno wynosić co najmniej 60 procent wartości nasycenia powietrzem (ASV) w wybranej temperaturze, a wartość pH w warstwie wody powyżej osadu powinna we wszystkich naczyniach używanych do badania znajdować się w przedziale 6–9,
- temperatura wody nie powinna różnić się o więcej niż $\pm 1,0$ °C. Temperaturę wody można kontrolować przy użyciu pomieszczenia izotermicznego i w takim przypadku temperatura pomieszczenia powinna być potwierdzana w stosownych odstępach czasowych.

OPIS METODY

Naczynia używane do badania

11. Badanie prowadzone jest w szklanych zlewkach o pojemności 600 ml i średnicy 8 cm. Inne naczynia także mogą nadawać się do badania, powinny jednak zapewniać odpowiednią głębokość warstwy osadu i warstwy wody powyżej. Powierzchnia osadu powinna być wystarczająca, by zapewnić od 2 do 3 cm² na larwę. Stosunek głębokości warstwy osadu do warstwy wody powyżej powinien wynosić 1:4. Naczynia do badania i inne przyrządy mające kontakt z układem badawczym powinny być w całości wykonane ze szkła lub innego chemicznie obojętnego materiału (np. teflonu).

Wybór gatunków

12. Gatunkiem wykorzystywanym w badaniu powinien być w miarę możliwości *Chironomus riparius*. Odpowiedni jest także *Chironomus tentans*, ale jest trudniejszy w hodowli i wymaga dłuższego okresu badania. Można także korzystać z *Chironomus yohimatsui*. Szczegóły metod hodowli dla *Chironomus riparius* podano w dodatku 2. Informacje dotyczące warunków hodowli są także dostępne dla innych gatunków, tj. *Chironomus tentans* (4) i *Chironomus yohimatsui* (11). Przed przeprowadzeniem badania należy potwierdzić identyfikację gatunków, ale nie jest to wymagane przed każdym badaniem, jeśli organizmy pochodzą z hodowli wewnątrzlaboratoryjnej.

Osad

13. W miarę możliwości należy stosować osad preparowany (zwany także osadem regenerowanym, sztucznym lub syntetycznym). Jeśli jednak korzysta się z osadu naturalnego, należy go scharakteryzować (co najmniej pod kątem pH, zawartości węgla organicznego, zaleca się także określenie innych parametrów, takich jak stosunek C/N i granulometria). Osad taki powinien być wolny od zanieczyszczeń i innych organizmów, które mogłyby konkurować z ohotkowatymi lub je zjadać. Zaleca się także, by przed jego wykorzystaniem w badaniu toksyczności dla ohotkowatych naturalny osad był przez siedem dni kondycjonowany w tych samych warunkach, jakie panować będą następnie podczas badania. Do wykorzystania w tym badaniu (1) (15) (16) zaleca się następujący osad preparowany oparty na sztucznej glebie stosowanej w metodzie badawczej C.8 (14):
 - a) torf 4–5 % (w przeliczeniu na suchą masę): wartość pH możliwie najbardziej zbliżona do przedziału 5,5 do 6,0; ważne jest, by stosować torf w postaci sproszkowanej, drobno zmielony (wielkość cząstek ≤ 1 mm) i suszony wyłącznie powietrzem;
 - b) glina kaolinowa 20 % (w przeliczeniu na suchą masę) (zawartość kaolinitu w miarę możliwości powyżej 30 %);
 - c) piasek kwarcowy 75–76 % (w przeliczeniu na suchą masę) (powinien przeważać drobny piasek, w którym ponad 50 % cząstek mierzy od 50 do 200 μm);
 - d) dla uzyskania wilgotności końcowej mieszanki na poziomie od 30–50 % dodaje się wodę dejonizowaną;
 - e) w celu skorygowania pH końcowej mieszaniny osadu do wartości $7,0 \pm 0,5$ dodaje się do niej chemicznie czysty węgiel wapnia (CaCO_3). Zawartość węgla organicznego w końcowej mieszaninie powinna wynosić 2 % ($\pm 0,5$ %) i należy ją skorygować przy użyciu odpowiednich ilości torfu i piasku, zgodnie z lit. a) i c).
14. Źródło torfu, gliny kaolinowej i piasku powinno być znane. Składniki osadu należy sprawdzić pod kątem zanieczyszczenia chemicznego (np. metalami ciężkimi, związkami chloroorganicznymi, związkami fosforoorganicznymi itp.). W dodatku 3 podano przykładowy sposób przygotowania osadu preparowanego. Dopuszczalne jest także mieszanie suchych składników, o ile wykaże się, że po dodaniu warstwy wody powyżej osadu składniki osadu się nie rozdzielają (np. nie unoszą się cząstki torfu) oraz że torf lub osad jest poddawany dostatecznemu kondycjonowaniu.

Woda

15. Jako wodę do badania można stosować każdy rodzaj wody, której charakterystyka zgodna jest z charakterystyką chemiczną wody nadającej się do rozcieńczania, jak opisano w dodatkach 2 i 4. Do hodowli ohotkowatych i do badania może służyć każdy odpowiedni rodzaj wody, np. woda naturalna (powierzchniowa lub gruntowa), woda regenerowana (zob. dodatek 2) lub odchlorowana woda wodociągowa, pod warunkiem że ohotkowane przeżyją w niej przez okres hodowli i badania bez wykazywania oznak stresu. Na początku badania wartość pH wody do

badania powinna wynosić od 6 do 9, a twardość ogółem wody wyrażona w zawartości CaCO₃ nie powinna być wyższa niż 400 mg/l. Jeśli jednak podejrzewa się, że między jonami powodującymi twardość wody a substancją badaną dochodzi do interakcji, powinna być stosowana woda o mniejszej twardości (a zatem w takim przypadku nie wolno używać pożywki Elenlda M4). Przez okres całego badania należy stosować ten sam rodzaj wody. Cechy jakości wody, wymienione w dodatku 4, należy mierzyć co najmniej dwa razy w roku lub ilekroć zachodzi podejrzenie, że mogły one ulec znacznej zmianie.

Roztwory podstawowe – osady wzbogacane

16. Wzbogacane osady o wybranym stężeniu substancji badanej są zwykle przygotowywane przez dodanie roztworu tej substancji bezpośrednio do osadu. Roztwór podstawowy substancji badanej rozpuszczonej w dejonizowanej wodzie miesza się z osadem gotowym z użyciem walcarki, mieszalnika lub ręcznie. Jeżeli substancja badana słabo rozpuszcza się w wodzie, można ją rozpuścić w odpowiednim rozpuszczalniku organicznym, w możliwie jak najmniejszej jego ilości (np. w heksanie, acetonie lub chloroformie). Roztwór taki następnie miesza się z drobnym piaskiem kwarcowym, w ilości 10 gramów na jedno naczynie. Rozpuszczalnikowi należy pozwolić wyparować i całkowicie zniknąć z piasku; piasek następnie miesza się z osadem w określonej ilości na każdą zlewkę. Do rozpuszczenia, rozrzedzenia lub zemulsyfikowania substancji badanej mogą być użyte jedynie łatwo ulatniające się czynniki. Należy mieć na uwadze, że przy preparowaniu osadu należy uwzględnić piasek zawarty w mieszance substancji badanej z piaskiem (czyli osad należy przygotować z mniejszej ilości piasku). Należy dopilnować, by substancja badana dodana do osadu została w nim starannie i równo rozprowadzona. W razie konieczności dla określenia jednorodności mieszanki należy zanalizować próbki.

PROJEKT BADANIA

17. Projekt badania obejmuje dobór liczby badanych stężeń i ich zróżnicowanie, liczby naczyń zawierających dane stężenie substancji i liczby larw na jedno naczynie. Opisano projekty dotyczące punktowego oszacowania wartości EC, oszacowania wartości NOEC i przeprowadzenia badania granicznego.

Projekt analizy regresyjnej

18. Stężenie powodujące zmiany (np. EC₁₅, EC₅₀) i zakres stężeń, powyżej którego skutki działania substancji badanej stają się przedmiotem zainteresowania, należy wyskalować z zastosowaniem stężeń ujętych w badaniu. Ogólnie, dokładność, a w szczególności ważność naukowa, z jaką można oszacować stężenia powodujące zmiany (EC_x), poprawia się, gdy stężenie powodujące zmiany wchodzi w zakres badanych stężeń. Należy unikać ekstrapolowania wyników znacznie poniżej najniższego stężenia dającego wynik dodatni lub powyżej najwyższego stężenia. Wstępne badanie ustalające zakres jest pomocne przy wyborze zakresu stężeń do zastosowania (zob. pkt 27).
19. Jeśli trzeba oszacować EC_x, należy zbadać co najmniej pięć stężeń i trzy replikaty dla każdego stężenia. W każdym przypadku zaleca się stosowanie dostatecznych stężeń substancji badanej, aby umożliwić dobre oszacowanie parametrów modelu. Współczynnik odstępów między stężeniami nie powinien być większy niż dwa (z wyjątkiem przypadków, gdy krzywa dawka-odpowiedź ma łagodny przebieg). Liczba replikatów przy każdym podaniu dawki substancji badanej może być zmniejszona, jeśli zwiększy się liczbę stężeń substancji badanej dających różne odpowiedzi. Zwiększenie liczby replikatów lub zmniejszenie wielkości odstępów między badanymi stężeniami zwykle prowadzi do zwężenia przedziałów ufności dla danego badania. Jeśli celem jest oszacowanie przeżycia i wzrostu larw w okresie 10 dni, wymagane są dodatkowe replikaty.

Projekt dotyczący oszacowania NOEC/LOEC

20. Jeśli celem jest oszacowanie wartości LOEC lub NOEC, należy zastosować pięć stężeń substancji badanej z co najmniej czterema replikatami, a współczynnik odstępów między stężeniami nie powinien być większy niż dwa. Liczba replikatów powinna być na tyle duża, by zapewnić odpowiednią moc statystyczną dla wykrycia 20 % różnicy z próbą kontrolną przy istotności wynoszącej 5 % (p = 0,05). W przypadku współczynnika rozwoju zwykle stosowna jest analiza wariancji (ANOVA), np. badanie Dunnetta i badanie Williamsa (17) (18) (19) (20). W przypadku współczynnika wylęgu można stosować test Cochran-Armitage'a, test dokładny Fishera (z korektą Bonferroniego) lub test Mantela-Haenszela.

Badanie graniczne

21. Jeśli we wstępnym badaniu ustalającym zakres nie zaobserwowano żadnych zmian, można przeprowadzić badanie graniczne (jedno stężenie badane i jedna próba kontrolna). Celem badania granicznego jest przeprowadzenie badania przy dostatecznie wysokim stężeniu substancji badanej, by umożliwić decydemtom wykluczenie jej ewentualnych toksycznych skutków, a granicę ustala się na poziomie stężenia, co do którego nie przewiduje się, by mogło kiedykolwiek wystąpić. Zaleca się stężenie 1 000 mg/kg (w przeliczeniu na suchą masę). Zazwyczaj konieczne jest co najmniej 6 replikatów zarówno dla próby poddawanej działaniu substancji, jak i dla próby kontrolnej. Należy wykazać odpowiednią moc statystyczną, która pozwala wykryć 20 % różnicę w porównaniu z próbą kontrolną przy 5 % poziomie istotności (p = 0,05). Przy odpowiedzi metrycznej (współczynnik rozwoju i masa) odpowiednią metodą statystyczną jest test t-Studenta, jeśli dane spełniają warunki tego testu (normalność rozkładu zmiennych, jednorodność wariancji). Jeśli te warunki nie są spełnione, można zastosować test t dla nierównych wariancji lub test nieparametryczny, np. test Manna-Whitneya-Wilcoxon. W przypadku współczynnika wylęgu odpowiedni jest test dokładny Fishera.

PROCEDURA

Warunki narażenia na działanie substancji*Przygotowanie układu osad wzbogacony – woda*

22. Dla podawania substancji badanej zalecana jest procedura wzbogacania opisana w metodzie badawczej C.8: Toksyczność dla dżdżownic (14). Osad wzbogacony umieszcza się w naczyniach, a następnie dodaje się wodę powyżej osadu, aby uzyskać współczynnik objętości osadu do wody równy 1:4 (zob. pkt 11 i 15). Głębokość warstwy osadu powinna znajdować się w przedziale 1,5-3 cm. Podczas dodawania badanej wody w celu uzyskania słupa wody nad osadem, aby uniknąć oddzielenia składników osadu i ponownego zawieszenia w wodzie drobnoziarnistego materiału, osad na czas zalewania można nakryć plastikowym krążkiem, a krążek następnie od razu usunąć. Właściwe może być także zastosowanie innych przyrządów.
23. Naczynia do badania powinny być przykryte (np. szklanymi płytkami). W razie konieczności w czasie badania poziom wody uzupełnia się do pierwotnej objętości, aby wyrównać jej ubytek spowodowany parowaniem. Należy w tym celu używać wody destylowanej lub dejonizowanej, aby zapobiec odkładaniu się soli.

Stabilizacja

24. Po tym jak zostanie już przygotowany osad wzbogacony z warstwą wody powyżej, należy umożliwić podział substancji badanej między fazą wodną i osadem (3) (4) (6) (13). W miarę możliwości powinno się to odbywać w tych samych warunkach temperatury i napowietrzenia, co panujące w badaniu. Okres ustalania stanu równowagi zależy od osadu i substancji chemicznej, i może być rzędu kilku godzin lub kilku dni, a w rzadkich przypadkach trwać do kilku tygodni (4–5 tygodni). Jako że jest to czas wystarczający dla rozkładu wielu chemikaliów, nie oczekuje się stanu równowagi, ale zaleca się stosowanie 48-godzinnego okresu ustalania równowagi. Na koniec tego dalszego okresu ustalania równowagi należy zmierzyć stężenie substancji badanej w warstwie wody powyżej osadu, wodzie porowej i w osadzie, co najmniej przy najwyższym stężeniu i przy niższym stężeniu (zob. pkt 38). Takie oznaczenia analityczne substancji badanej umożliwiają obliczenie bilansu masy i wyrażenie wyników w oparciu o zmierzone stężenia.

Dodanie organizmów badanych

25. Na cztery do pięciu dni przed umieszczeniem organizmów badanych w naczyniach używanych do badania pakiety jaj należy wyjąć z hodowli i umieścić w małych naczyniach w pożywce hodowlanej. Można w tym celu zastosować pożywkę wykorzystywaną w hodowli podstawowej lub pożywkę świeżo przygotowaną. Jeśli stosowana jest ta ostatnia, do pożywki hodowlanej należy dodać niewielką ilość pokarmu, np. zielenice lub kilka kropel filtratu z drobno zmielonej zawiesiny pokarmu w płatkach dla ryb (zob. dodatek 2). Należy korzystać wyłącznie ze świeżo złożonych pakietów jaj. Wylęg larw zaczyna się przeważnie kilka dni po złożeniu pakietów jaj (2 do 3 dni w przypadku *Chironomus riparius* w temperaturze 20 °C oraz 1 do 4 dni w przypadku *Chironomus tentans* w temperaturze 23 °C i *Chironomus yoshimatsui* w temperaturze 25 °C), a wzrost larw następuje w czterech stadiach larwalnych, przy czym każde z nich trwa od 4 do 8 dni. Do badania należy stosować larwy w pierwszym stadium larwalnym (2–3 lub 1–4 dni po wylęgu). Stadium rozwoju kuczmanów można sprawdzić stosując pomiar szerokości puszki głowowej (6).
26. Dwadzieścia larw w pierwszym stadium larwalnym przydziela się losowo do każdego naczynia doświadczalnego zawierającego osad wzbogacony i wodę przy użyciu tępo zakończonyj pipety. Po wprowadzeniu larw do naczyń należy zatrzymać napowietrzanie wody i nie uruchamiać go przez dobę po ich wprowadzeniu (zob. pkt 25 i 32). Zgodnie z zastosowanym projektem badania (zob. pkt 19 i 20) w celu oszacowania punktu EC należy zastosować co najmniej 60 larw na stężenie, a w celu oznaczenia wartości NOEC - 80 larw.

Badane stężenia

27. Badanie ustalające zakres może być przydatne do określenia zakresu stężeń dla ostatecznego badania. W tym celu stosuje się szereg roztworów o znacznie różniących się od siebie stężeniach substancji badanej. Aby zapewnić tę samą gęstość powierzchni na ochotkowate, co stosowana w ostatecznym badaniu, ochotkowate poddaje się narażeniu na każde stężenie substancji badanej przez okres pozwalający oszacować odpowiednie jej stężenie badane i nie wymagane są replikaty.
28. Decyzje dotyczące stężeń substancji badanej w ostatecznym badaniu podejmuje się w oparciu o wynik badania ustalającego zakres. Jak opisano w pkt 18 do 20, należy zastosować i wybrać co najmniej pięć stężeń.

Próby kontrolne

29. Naczynia zawierające próby kontrolne bez substancji badanej, ale zawierające osad, powinny być uwzględnione w badaniu z odpowiednią liczbą replikatów (zob. pkt 19 i 20). Jeśli do wprowadzenia substancji badanej został użyty rozpuszczalnik (zob. pkt 16), należy dodać próbę kontrolną zawierającą osad z rozpuszczalnikiem.

Układ badawczy

30. Stosowane są układy statyczne. W wyjątkowych przypadkach, na przykład gdy określone w specyfikacjach cechy jakości wody staną się nieodpowiednie dla organizmu badanego lub naruszą równowagę chemiczną (np. poziomy rozpuszczonego tlenu spadną zbyt nisko, stężenie produktów wydalniczych za bardzo wzrosnie lub nastąpi uwalnianie minerałów z osadu, które wpłynie na wartość pH lub twardość wody) można stosować układy półstatyczne lub przepływowe z okresowym lub stałym odnawianiem wody powyżej osadu. Inne metody poprawy jakości wody powyżej osadu, np. napowietrzanie, zwykle jednak wystarczają i należy w miarę możliwości z nich korzystać.

Pokarm

31. Larwy trzeba karmić, w miarę możliwości codziennie lub co najmniej trzy razy w tygodniu. Odpowiedni do karmienia młodych larw przez pierwsze 10 dni wydaje się pokarm dla ryb (zawiesina w wodzie lub drobno zmielony pokarm, np. Tetra-Min lub Tetra-Phyll; zob. szczegółowe informacje w dodatku 2) w ilości 0,25-0,5 mg (0,35-0,5 mg w przypadku *C. yoshimatsui*) na larwę dziennie. Starsze larwy mogą potrzebować nieco więcej pokarmu: 0,5-1 mg na larwę na dzień powinno być wystarczającą ilością przez pozostałą część badania. Jeśli obserwuje się wzrost grzybów lub śmiertelność w próbach kontrolnych, należy wówczas we wszystkich próbach kontrolnych i doświadczalnych ograniczyć i kontrolować ilość pokarmu. Jeśli nie można powstrzymać rozwoju grzybów, należy powtórzyć badanie. Przy badaniu substancji silnie adsorbujących (np. o $\log K_{ow} > 5$) lub w przypadku substancji tworzących wiązanie kowalencyjne z osadem, ilość pokarmu niezbędną do zapewnienia przeżycia i naturalnego wzrostu organizmów można dodać do osadu preparowanego przed okresem stabilizacji. W tym celu zamiast pokarmu dla ryb należy stosować surowiec roślinny, np. dodatek 0,5 % (w przeliczeniu na suchą masę) drobno zmielonych liści np. pokrzywy zwyczajnej (*Urtica dioica*), morwy białej (*Morus alba*), koniczyzny białej (*Trifolium repens*), szpinaku (*Spinacia oleracea*), można też użyć innego surowca roślinnego (produktu Cerophyl lub alfa-celulozy).

Warunki inkubacji

32. W miarę możliwości w ciągu 24 godzin od wprowadzenia larw należy zapewnić delikatne napowietrzanie warstwy wody powyżej osadu w naczyniach do badania, a następnie kontynuować je przez cały okres badania (należy dopilnować, by stężenie rozpuszczonego tlenu nie spadło poniżej 60 procent ASV). Napowietrzanie prowadzone jest z użyciem szklanej pipety Pasteura przytwierdzonej 2-3 cm nad warstwą osadu (tj. w ilości jednego lub kilku bąbli powietrza/sek.). Przy badaniu lotnych chemikaliów można rozważyć nienapowietrzanie układu osad-woda.
33. Badanie przeprowadza się w stałej temperaturze 20 °C (± 2 °C). Zalecane temperatury w przypadku *C. tentans* i *C. yoshimatsui* to odpowiednio 23 °C i 25 °C (± 2 °C). Stosuje się 16-godzinny fotoperiod, a natężenie światła powinno wynosić od 500 do 1 000 luksów.

Czas trwania narażenia

34. Czas trwania narażenia rozpoczyna się od wprowadzenia larw do naczyń z próbą wzbogaconą i naczyń zawierających próby kontrolne. Maksymalny czas trwania narażenia wynosi 28 dni w przypadku *C. riparius* i *C. yoshimatsui*, a w przypadku *C. tentans* 65 dni. Jeśli kuczmany wylęgną się wcześniej, badanie można zakończyć po co najmniej pięciu dniach od wylęgu ostatniego dorosłego osobnika w próbie kontrolnej.

Obserwacje

Wylęg osobników dorosłych

35. Należy określić czas rozwoju i całkowitą liczbę w pełni wylęgniętych samców i samic kuczmanów. Samce łatwo zidentyfikować dzięki ich pierzastym czułkom.
36. Naczynia do badania należy obserwować co najmniej trzy razy w tygodniu w celu wzrokowej oceny ewentualnego nieprawidłowego zachowania (np. porzucanie osadu, nietypowy sposób pływania) w porównaniu z próbą kontrolną. W okresie spodziewanego wylęgu kuczmanów konieczne jest codzienne ich zliczanie. Płeć i liczbę w pełni wylęgniętych kuczmanów należy zapisywać codziennie. Po identyfikacji kuczmany usuwane są z naczyń. Pakiety jaj złożone przed zakończeniem badania należy odnotować, a następnie usunąć, by zapobiec ponownemu wprowadzeniu larw do osadu. Należy także odnotować liczbę widocznych poczwarek, z których nie wylęły się kuczmany. Wytyczne dotyczące pomiaru wylęgu zawarte są w dodatku 5.

Wzrost i przeżycie

37. Jeśli mają być dostarczone dane dotyczące 10-dniowego przeżycia i wzrostu larw, należy na początku włączyć do badania dodatkowe naczynia, by mogły być w tym celu wykorzystane. Aby zebrać larwy, osad z tych dodatkowych naczyń należy przesiać, używając sita 250 μ m. Kryteriami zgonu są nieruchomość lub brak reakcji na bodziec mechaniczny. Larwy nieodzyskane należy także liczyć jako martwe (larwy, które padły na początku badania, mogły zostać rozłożone przez drobnoustroje). Należy określić suchą masę (bez popiołu) larw pozostałych przy życiu na każde naczynie do badania i obliczyć średnią suchą masę pojedynczej larwy na każde naczynie. Przydatne jest określenie, w którym stadium larwalnym znajdują się larwy pozostałe przy życiu; w tym celu można stosować pomiar puszki głowowej każdego osobnika.

Pomiary analityczne

Stężenie substancji badanej

38. Przed rozpoczęciem badania (np. wprowadzeniem larw) z co najmniej jednego naczynia na każde doświadczenie pobiera się próbki całej objętości osadu w celu dokonania pomiarów analitycznych stężenia substancji badanej w osadzie. Zaleca się, by na początku i na końcu badania przeanalizować co najmniej próbki wody z warstwy powyżej osadu, wody porowej i osadu (zob. pkt 24), przy najwyższym stężeniu i przy niższym stężeniu. Takie oznaczenie stężenia substancji badanej daje wiedzę na temat zachowania/podziału substancji badanej w układzie woda-osad.
39. Gdy dokonuje się pomiarów pośrednich (np. w 7. dniu) lub jeśli do analizy potrzeba dużych próbek, których nie można pobrać z naczyń do badania bez wpływania na układ badawczy, należy dokonać oznaczeń analitycznych na próbkach pochodzących z dodatkowych naczyń do badania przygotowanych w ten sam sposób (zawierających także organizmy badane), ale niewykorzystywanych do obserwacji biologicznych.
40. Aby oddzielić wodę porową, zaleca się odwirowanie osadu przy 10 000 g w temp. 4 °C przez 30 min. Jeśli jednak substancja badana nie adsorbuje się na filtrze, dopuszczalna jest też filtracja. W niektórych przypadkach zanalizowanie stężeń w wodzie porowej może nie być możliwe, ponieważ wielkość próbki jest zbyt mała.

Parametry fizykochemiczne

41. Wartość pH i temperatura w naczyniach do badania powinny być odpowiednio mierzone (zob. pkt 10). Twardość i zawartość amoniaku należy zmierzyć w próbach kontrolnych i w jednym naczyniu do badania przy najwyższym stężeniu na początku i na końcu badania.

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Opracowanie wyników

42. Celem badania jest określenie wpływu substancji badanej na współczynnik rozwoju i całkowitą liczbę w pełni wylęgniętych samic i samców kuczmanów lub, w przypadku badań 10-dniowych, skutków dla przeżycia i masy larw. Jeśli nie ma wskazań dotyczących statystycznie istotnych różnic we wrażliwości osobników każdej płci, wyniki dotyczące osobników męskich i żeńskich mogą zostać połączone do celów analizy statystycznej. Różnice we wrażliwości między płciami można oszacować statystycznie z wykorzystaniem np. tablicy rozkładu chi-kwadrat $\chi^2-r \times 2$. W razie konieczności przeżycie larw i średnią suchą masę larwy na naczynie należy określić po 10 dniach.
43. Wartości stężeń powodujące zmiany, wyrażone w suchej masie, należy obliczyć w miarę możliwości w oparciu o zmierzone stężenia substancji w osadzie na początku badania (zob. pkt 38).
44. Aby obliczyć oszacowanie punktowe dla EC_{50} i innych EC_x , jako prawdziwe replikaty można wykorzystywać dane statystyczne dotyczące poszczególnych naczyń. Przy wyliczaniu przedziału ufności dla EC_x należy uwzględnić zmienność między naczyniami lub należy wykazać, że zmienność ta jest tak niewielka, że można ją pominąć. Jeżeli model został dopasowany przy użyciu metody najmniejszych kwadratów, do danych statystycznych dotyczących poszczególnych naczyń należy zastosować przekształcenie, aby poprawić jednorodność wariancji. Wartości EC_x należy jednak liczyć po przekształceniu odpowiedzi z powrotem do wartości pierwotnej.
45. W przypadku gdy analiza statystyczna ma na celu określenie wartości NOEC/LOEC przez zastosowanie badania hipotezy statystycznej, należy wziąć pod uwagę zmienność między naczyniami, np. przez zastosowanie zagnieżdżonej analizy wariancji. Ewentualnie w przypadkach, w których występują naruszenia zwykłych założeń analizy wariancji, odpowiednie mogą być bardziej odporne testy (21).

Współczynnik wylęgu

46. W przypadku gdy oczekuje się monotonicznej zależności dawka-odpowieź, a dane te są spójne z tym oczekiwaniem, współczynniki wylęgu, które są danymi dwuwartościowymi, można zanalizować z użyciem testu Cochran-Armitage'a stosowanego na zasadzie krokowej wstecznej. W innym przypadku można zastosować test dokładny Fishera lub test Mantela-Haenszela z granicznym poziomem istotności skorygowanym metodą Bonferroni-Holma. Jeśli są dowody na większą zmienność między replikatami w ramach tego samego stężenia, niż wskazywałby na to rozkład dwumianowy (co określa się często jako zmienność większą niż zmienność w rozkładzie dwumianowym), wówczas należy zastosować odporny test Cochran-Armitage'a lub test dokładny Fishera, tak jak proponuje się w pozycji (21) w bibliografii.

Suma kuczmanów wylęgniętych na każde naczynie, n_e , jest określana i dzielona przez liczbę wprowadzonych larw, n_a :

$$ER = \frac{n_e}{n_a}$$

gdzie:

ER = współczynnik wylęgu,

n_e = liczba wylęgniętych kuczmanów na każde naczynie,

n_a = liczba wprowadzonych larw na każde naczynie.

47. Najwłaściwszą alternatywą w przypadku dużych próbek, w których występuje wariancja większa niż wariancja w rozkładzie dwumianowym, jest traktowanie współczynnika wylęgu jako zmiennej ciągłej i stosowanie takich procedur jak test Williama, gdy oczekuje się monotonicznej zależności dawka-odpowiedź i oczekiwanie to jest zgodne z danymi dotyczącymi współczynnika wylęgu. Jeśli założenie dotyczące monotoniczności nie jest spełnione, odpowiedni byłby test Dunnetta. Uznaje się, że próbka jest duża, gdy zarówno liczba wylęgniętych kuczmanów, jak i liczba larw, z których one nie powstały, przekracza pięć na każde naczynie stanowiące replikat.
48. Aby zastosować metody analizy wariancji, wartości współczynnika wylęgu należy najpierw przekształcić, stosując przekształcenie pierwiastkowe i arcsin lub przekształcenie Freemana-Tukeya w celu otrzymania przybliżonego normalnego rozkładu i wyrównania wariancji. Przy użyciu częstości bezwzględnej można zastosować test Cochran-Armitage'a, test dokładny Fishera (z korektą Bonferronięgo) lub test Mantela-Haenszela. Przekształcenie pierwiastkowe i arcsin stosuje się przez wyznaczenie funkcji odwrotnej względem sinusa (\sin^{-1}) pierwiastka współczynnika wylęgu.
49. W przypadku współczynników wylęgu wartości EC_x oblicza się, stosując analizę regresji (lub np. analizę probitową (22), logitową, analizę Weibulla, odpowiednie oprogramowanie komercyjne itd.). Jeśli analiza regresji zawodzi (np. w przypadku gdy występują mniej niż dwie częściowe odpowiedzi), stosuje się inne metody nieparametryczne, takie jak średnia krocząca lub prosta interpolacja.

Współczynnik rozwoju

50. Średnia czasu rozwoju to średni czas od wprowadzenia larw (dzień 0 badania) do wylęgu kuczmanów tworzących kohortę badań (w celu policzenia rzeczywistego czasu rozwoju należy uwzględnić wiek larw w chwili wprowadzenia). Współczynnik rozwoju stanowi odwrotność czasu rozwoju (jednostka: 1/dzień) i przedstawia tę część rozwoju larwy, która następuje każdego dnia. Do celów oceny omawianych badań dotyczących toksyczności w osadzie preferowany jest współczynnik rozwoju, jako że jego wariancja jest mniejsza, jest bardziej jednorodny i bliższy normalnemu rozkładowi w porównaniu z czasem rozwoju. Dlatego silne metody parametryczne badania stosować można raczej w odniesieniu do współczynnika rozwoju niż do czasu rozwoju. Dla współczynnika rozwoju jako odpowiedzi ciągłej można szacować wartości EC_x , stosując analizę regresji (zob. np. (23) (24)).
51. Do celów poniższych badań statystycznych przyjmuje się, że liczba kuczmanów zaobserwowanych w dniu kontroli x wylęła się w średniej arytmetycznej odstęp czasu między dniem x a dniem $x-1$ (1 = długość odstęp czasu między kontrolami, zwykle 1 dzień). Średnia arytmetyczna współczynnika rozwoju na każde naczynie (x) liczona jest według następującego wzoru:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^m f_i x_i}{n_e}$$

gdzie:

\bar{x} : średnia arytmetyczna współczynnika rozwoju na każde naczynie,

i : wskaźnik odstęp czasu między kontrolami,

m : maksymalna liczba odstępów czasowych między kontrolami,

f_i : liczba kuczmanów wylęgniętych w odstępie czasowym między kontrolami i ,

n_e : całkowita liczba kuczmanów wylęgniętych na koniec doświadczenia, ($= \sum f_i$)

x_i : współczynnik rozwoju kuczmanów wylęgniętych w odstępie czasowym między kontrolami i ,

$$x_i = \frac{1}{\left(\text{day}_i - \frac{1}{2}\right)}$$

gdzie:

day_i : dzień kontroli (dni od wprowadzenia),

l_i : długość odstęp czasu między kontrolami i (w dniach, zwykle 1 dzień).

Sprawozdanie z badania

52. Sprawozdanie z badania musi zawierać co najmniej następujące informacje:

Substancja badana

- cechy fizyczne i w stosownych przypadkach właściwości fizykochemiczne (rozpuszczalność w wodzie, prężność par, współczynnik podziału w glebie (lub w osadzie, jeśli jest dostępny), stabilność w wodzie itd.),
- dane identyfikacyjne substancji chemicznej (nazwa zwyczajowa, nazwa chemiczna, numer CAS, wzór strukturalny) w tym czystość i metoda analityczna oznaczania ilościowego substancji badanej.

Badany gatunek

- zwierzęta wykorzystane w badaniu: gatunek, nazwa naukowa, źródło organizmów i warunki hodowli,
- informacje dotyczące postępowania z pakietami jaj i larwami,
- wiek zwierząt badanych w chwili umieszczenia w naczyniu do badania.

Warunki badania

- użyty osad, tj. osad naturalny lub preparowany,
- w przypadku osadu naturalnego – lokalizacja i opis miejsca pobrania próbki osadu, w tym, jeśli to możliwe, historia zanieczyszczenia; charakterystyka: pH, zawartość węgla organicznego, stosunek C/N i granulometria (w stosownych przypadkach),
- przygotowanie osadu preparowanego: składniki i charakterystyka (zawartość węgla organicznego, pH, wilgotność itd. na początku badania),
- przygotowanie wody do badania (jeśli stosowana jest woda regenerowana) i jej charakterystyka (stężenie tlenu, pH, przewodność właściwa, twardość itd. na początku badania),
- głębokość warstwy osadu i warstwy wody powyżej,
- objętość warstwy wody powyżej osadu i wody porowej; masa mokrego osadu z wodą porową i bez niej,
- naczynia do badania (materiał i wielkość),
- metoda wzbogacania osadu: użyte stężenia badane, liczba replikatów i użyty rozpuszczalnik, jeśli go zastosowano,
- faza stabilizacji i równowagi układu wzbogacony osad-woda: czas trwania i warunki,
- warunki inkubacji: temperatura, cykl i natężenie oświetlenia, napowietrzanie (częstotliwość i natężenie),
- szczegółowe informacje o żywieniu, w tym rodzaj pokarmu, przygotowanie, schemat żywienia i ilość pokarmu.

Wyniki

- nominalne stężenia badane, zmierzone stężenia badane i wyniki wszystkich analiz ustalających stężenia substancji badanej w naczyniach do badań,
- jakość wody w naczyniach do badania, tj. pH, temperatura, rozpuszczony tlen, twardość i zawartość amoniaku,
- uzupełnienie wyparowanej wody do badania, jeśli nastąpiło,
- liczbę wylęgniętych męskich i żeńskich kuczmanów na każde naczynie na każdy dzień,
- liczbę larw, z których nie wylęgły się kuczmany, na każde naczynie,
- w stosownych przypadkach, średnia sucha masa larw na każde naczynie do badania i na każde stadium larwalne,
- odsetek wylęgniętych kuczmanów na każdy replikat i na każde stężenie substancji badanej (samice i samce kuczmanów łącznie),

- średni współczynnik rozwoju w pełni wylęgniętych kuczmanów na każdy replikat i współczynnik poddania działaniu substancji badanej (samice i samce kuczmanów łącznie),
- oszacowania toksycznych punktów końcowych, np. EC_x (i powiązane przedziały ufności), wartość stężenia, przy którym nie obserwuje się szkodliwych zmian (NOEC), lub najniższe stężenie, przy którym obserwuje się szkodliwe zmiany (LOEC) oraz metody statystyczne użyte w celu ich określenia,
- omówienie wyników, w tym ewentualny wpływ na wynik badania będący skutkiem odstępstw od niniejszej metody badawczej.

BIBLIOGRAFIA:

- (1) BBA (1995). Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system. M. Streloke i H. Köpp (red.). Berlin 1995.
- (2) Fleming R i in. (1994). Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances. Sprawozdanie końcowe dla Komisji Europejskiej. Nr sprawozdania: EC 3738. Sierpień 1994. WRc, Zjednoczone Królestwo.
- (3) SETAC (1993). Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments. Materiały z warsztatów WOSTA zorganizowanych w Niderlandach.
- (4) ASTM International/E1706-00 (2002). Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. pp 1125-1241. W: ASTM International 2002 Annual Book of Standards. Tom 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM. International, West Conshohocken, PA.
- (5) Environment Canada (1997). Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*). Biological Test Method. Sprawozdanie SPE 1/RM/32. Grudzień 1997.
- (6) US-EPA (2000). Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. Wyd. drugie. EPA 600/R-99/064. Marzec 2000. Zmiana wydania pierwszego z czerwca 1994 r.
- (7) US-EPA/OPPTS 850.1735. (1996): Whole Sediment Acute Toxicity Invertebrates.
- (8) US-EPA/OPPTS 850.1790. (1996): Chironomid Sediment toxicity Test.
- (9) Milani D, Day KE, McLeay DJ, and Kirby RS (1996). Recent intra- and inter-laboratory studies related to the development and standardisation of Environment Canada's biological test methods for measuring sediment toxicity using freshwater amphipods (*Hyalella azteca*) and midge larvae (*Chironomus riparius*). Technical Report. Environment Canada. National Water Research Institute. Burlington, Ontario, Kanada.
- (10) Sugaya Y (1997). Intra-specific variations of the susceptibility of insecticides in *Chironomus yoshimatsui*. Jp. J. Sanit. Zool. 48 (4): 345–350.
- (11) Kawai K (1986). Fundamental studies on Chironomid allergy. I. Culture methods of some Japanese Chironomids (Chironomidae, Diptera). Jp. J. Sanit. Zool. 37(1): 47–57.
- (12) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment nr 23.
- (13) Environment Canada (1995). Guidance Document on Measurement of Toxicity Test Precision Using Control Sediments Spiked with a Reference Toxicant. Sprawozdanie EPS 1/RM/30. Wrzesień 1995 r.
- (14) Metoda badawcza C.8 z niniejszego załącznika: Toksyczność dla dżdżownic.
- (15) Suedel BC and JH Rodgers (1994). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. Environ. Toxicol. Chem. 13: 1163–1175.
- (16) Naylor C and C Rodrigues (1995). Development of a test method for *Chironomus riparius* using a formulated sediment. Chemosphere 31: 3291–3303.

- (17) Dunnett CW (1964). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. *J. Amer. Statist. Assoc.*, 50: 1096–1121.
- (18) Dunnett CW (1964). New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics*, 20: 482–491.
- (19) Williams DA (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. *Biometrics*, 27: 103–117.
- (20) Williams DA (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. *Biometrics*, 28: 510–531.
- (21) Rao JNK and Scott AJ (1992). A simple method for the analysis of clustered binary data. *Biometrics* 48: 577–585.
- (22) Christensen ER (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. *Water Research* 18: 213–221.
- (23) Bruce and Versteeg (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. *Environmental Toxicology and Chemistry* 11: 1485–1494.
- (24) Slob W (2002). Dose-response modelling of continuous endpoints. *Toxicol. Sci.* 66: 298–312.
-

Dodatek 1

DEFINICJE

Dla celów niniejszej metody badawczej stosowane są następujące definicje:

Osad preparowany lub regenerowany, sztuczny lub syntetyczny, stanowi mieszaninę materiałów używaną do naśladowania składników fizycznych naturalnego osadu.

Warstwa wody powyżej osadu to woda, którą zalano osad w naczyniu do badania.

Woda porowa to woda wypełniająca przestrzeń między cząstkami osadu i gleby.

Osad wzbogacony to osad, do którego dodano substancję badaną.

Badana substancja chemiczna: każda substancja lub mieszanina badana za pomocą niniejszej metody badawczej.

Dodatek 2

Zalecenia dotyczące hodowli *Chironomus riparius*

1. Larwy ochotki (*Chironomus*) można hodować w naczyniach krystalizacyjnych lub większych zbiornikach. Na dnie zbiornika rozprowadza się drobny piasek kwarcowy, tworząc ciekłą warstwę grubości od 5 do 10 mm. Odpowiednim substratem okazała się także ziemia okrzemkowa (np. Merck, Art 8117), w przypadku której wystarczająca jest cieńsza warstwa grubości najwyżej kilku milimetrów. Następnie dodaje się odpowiednią wodę na głębokość kilku centymetrów. Poziomy wody należy uzupełniać, aby wyrównać stratę spowodowaną parowaniem i zapobiec wysychaniu. Wodę w razie konieczności można zastępować. Należy zapewnić delikatne napowietrzanie. Naczynia do chowu larw należy przechowywać w odpowiedniej klatce, aby zapobiec ucieczce wylęgniętych osobników dorosłych. Klatka powinna być na tyle duża, by umożliwić rojenie wylęgniętych osobników dorosłych, inaczej może nie dojść do kopulacji (co najmniej ok. 30 × 30 × 30 cm).
2. Klatki powinny być trzymane w temperaturze pokojowej lub w pomieszczeniu o stałych warunkach środowiska w temperaturze 20 ± 2 °C z fotoperiodem wynoszącym 16 godzin światła (o natężeniu ok. 1 000 luksów) i 8 godzin ciemności. Odnotowywano, że wilgotność powietrza mniejsza niż 60 % RH może przeszkodzić rozmnażaniu.

Woda do rozcieńczania

3. Można stosować każdy rodzaj wody naturalnej lub syntetycznej. Powszechnie stosowana jest woda gruntowa, odchlorowana woda wodociągowa i sztuczne pożywki (np. pożywka Elencta »M4« lub »M7«, zob. także poniżej). Woda przed użyciem powinna być napowietrzona. W miarę potrzeby woda do hodowli może być odnawiana przez ostrożne odlewanie lub wypłukiwanie zużytej wody z naczyń hodowlanych bez niszczenia oprzędów larw.

Karmienie larw

4. Larwy *Chironomus* należy karmić pokarmem w płatkach dla ryb (Tetra Min®, Tetra Phyll® lub innej marki pokarmem dla ryb) w ilości ok. 250 mg na każde naczynie na dzień. Można go podawać w postaci suchego mielonego proszku lub jako zawiesinę w wodzie: 1 g pokarmu w płatkach dodaje się do 20 ml wody do rozcieńczenia i rozdrabnia się do uzyskania jednorodnej mieszanki. Preparat ten można stosować jako pokarm w ilości ok. 5 ml na każde naczynie na dzień (przed użyciem wstrząsnąć). Starsze larwy mogą dostawać go więcej.
5. Żywienie dostosowuje się do jakości wody. Jeśli pożywka do hodowli staje się mętna, należy ograniczyć karmienie. Podawanie pokarmu należy starannie monitorować. Zbyt mała ilość pożywienia spowoduje migrację larw w kierunku słupa wody, a zbyt duża wywoła zwiększoną aktywność drobnoustrojów i zmniejszone stężenie tlenu. Oba rodzaje warunków mogą spowodować ograniczenie współczynnika wzrostu.
6. Przy przygotowywaniu nowych naczyń do hodowli można też dodać komórki niektórych gatunków zielenic (np. *Scenedesmus subspicatus*, *Chlorella vulgaris*).

Karmienie wylęgniętych osobników dorosłych

7. Niektórzy badacze sugerują, by do karmienia wylęgniętych osobników dorosłych używać tamponu z wełny bawełnianej nasączonego nasyconym roztworem sacharozy.

Wylęg osobników dorosłych

8. Przy temperaturze 20 ± 2 °C po ok. 13–15 dniach w naczyniach do hodowli z larw wylęgną się osobniki dorosłe. Samce łatwo zidentyfikować dzięki pierzastym czułkom.

Pakiety jaj

9. Po tym, jak osobniki dorosłe pojawiają się w klatce hodowlanej, należy trzy razy w tygodniu sprawdzać we wszystkich naczyniach do chowu larw, czy nie zostały złożone galaretowate pakiety jaj. Jeśli tak, należy je ostrożnie usunąć, a następnie przenieść do niewielkiego naczynia zawierającego próbkę wody używanej do hodowli. Pakiety jaj wykorzystuje się do zapoczątkowania hodowli w nowym naczyniu (np. od 2 do 4 pakietów jaj na naczynie) lub do badań toksyczności.

10. Larwy w pierwszym stadium larwalnym powinny wylęgnąć się po 2–3 dniach.

Przygotowanie hodowli w nowych naczyniach

11. Po tym, jak hodowle zostaną założone, powinno być możliwe przygotowanie nowej hodowli larw w świeżym naczyniu raz na tydzień lub rzadziej, w zależności od wymogów badania, przy czym starsze naczynia, po wylęgnięciu się w nich dorosłych kuczmanów, usuwa się. Stosując ten układ, uzyskuje się stałą podaż dorosłych osobników przy zminimalizowaniu zarzadzania.

Przygotowanie roztworów testowych »M4« i »M7«

12. Pożywka »M4« została opisana przez Elennta (1990). Pożywkę »M7« przygotowuje się jak pożywkę »M4«, z wyjątkiem substancji wskazanych w tabeli 1, których stężenie w »M7« jest czterokrotnie mniejsze niż w »M4«. Publikacja na temat pożywki »M7« znajduje się w przygotowaniu (Elennt, informacje własne). Roztwór testowy nie powinien być przygotowywany zgodnie z instrukcjami Elennta i Biasa (1990), ponieważ stężenia $\text{NaSiO}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$, NaNO_3 , KH_2PO_4 oraz K_2HPO_4 podane dla przygotowania roztworów podstawowych nie są odpowiednie.

Przygotowanie pożywki »M7«

13. Każdy roztwór podstawowy (I) przygotowuje się oddzielnie, a z roztworów podstawowych (I) przygotowuje się łączony roztwór podstawowy (II) (zob. tabela 1). Pięćdziesiąt ml łączonego roztworu podstawowego (II) oraz podane w tabeli 2 ilości każdego roztworu podstawowego makroskładnika odżywczego dopełnia się do 1 litra wodą dejonizowaną, aby przygotować pożywkę »M7«. Roztwór podstawowy witamin przygotowuje się przez dodanie trzech witamin do wody dejonizowanej, jak wskazano w tabeli 3. Do końcowej pożywki »M7« na krótko przed użyciem dodaje się 0,1 ml łączonego roztworu podstawowego witamin (roztwór podstawowy witamin przechowuje się zamrożony w małych podwielokrotnościach.) Pożywka jest napowietrzana i stabilizowana.

BIBLIOGRAFIA

BBA (1995). Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*. Development and validation of a new test system. Edited by M. Strelke and H. Köpp. Berlin 1995.

Tabela 1

Roztwory podstawowe pierwiastków śladowych dla pożywek M4 i M7

| Roztwory podstawowe (I) | Ilość (mg) dopełniana do 1 litra wodą dejonizowaną | W celu przygotowania łączonego roztworu podstawowego (II): zmieszać następujące ilości (ml) roztworów podstawowych (I) i dopełnić do 1 litra wodą dejonizowaną | | Końcowe stężenia w roztworach testowych (mg/l) | |
|--|--|--|------|--|---------|
| | | M4 | M7 | M4 | M7 |
| H_3BO_3 ⁽¹⁾ | 57 190 | 1,0 | 0,25 | 2,86 | 0,715 |
| $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ ⁽¹⁾ | 7 210 | 1,0 | 0,25 | 0,361 | 0,090 |
| LiCl ⁽¹⁾ | 6 120 | 1,0 | 0,25 | 0,306 | 0,077 |
| RbCl ⁽¹⁾ | 1 420 | 1,0 | 0,25 | 0,071 | 0,018 |
| $\text{SrCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ ⁽¹⁾ | 3 040 | 1,0 | 0,25 | 0,152 | 0,038 |
| NaBr ⁽¹⁾ | 320 | 1,0 | 0,25 | 0,016 | 0,004 |
| $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ⁽¹⁾ | 1 260 | 1,0 | 0,25 | 0,063 | 0,016 |
| $\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ⁽¹⁾ | 335 | 1,0 | 0,25 | 0,017 | 0,004 |
| ZnCl_2 | 260 | 1,0 | 1,0 | 0,013 | 0,013 |
| $\text{CaCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ | 200 | 1,0 | 1,0 | 0,010 | 0,010 |
| KI | 65 | 1,0 | 1,0 | 0,0033 | 0,0033 |
| Na_2SeO_3 | 43,8 | 1,0 | 1,0 | 0,0022 | 0,0022 |
| NH_4VO_3 | 11,5 | 1,0 | 1,0 | 0,00058 | 0,00058 |
| $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ^{(1) (2)} | 5 000 | 20,0 | 5,0 | 2,5 | 0,625 |
| $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ ^{(1) (2)} | 1 991 | 20,0 | 5,0 | 1,0 | 0,249 |

⁽¹⁾ Te substancje różnią się w przypadku M4 i M7, jak określono wyżej.

⁽²⁾ Roztwory te są przygotowywane oddzielnie, następnie zlewane razem i niezwłocznie autoklawowane.

Tabela 2

Roztwory podstawowe makroskładników odżywczych w przypadku pożywek M4 i M7

| | Ilość (mg) dopełniana do 1 litra wodą dejonizowaną | Ilość (ml/l) roztworów podstawowych makroskładników odżywczych w celu przygotowania pożywek M4 i M7 | Końcowe stężenia (mg/l) w roztworach testowych pożywek M4 i M7 |
|---|--|---|--|
| CaCl ₂ · 2 H ₂ O | 293 800 | 1,0 | 293,8 |
| MgSO ₄ · 7 H ₂ O | 246 600 | 0,5 | 123,3 |
| KCl | 58 000 | 0,1 | 5,8 |
| NaHCO ₃ | 64 800 | 1,0 | 64,8 |
| NaSiO ₃ · 9 H ₂ O | 50 000 | 0,2 | 10,0 |
| NaNO ₃ | 2 740 | 0,1 | 0,274 |
| KH ₂ PO ₄ | 1 430 | 0,1 | 0,143 |
| K ₂ HPO ₄ | 1 840 | 0,1 | 0,184 |

Tabela 3

Roztwór podstawowy witamin dla pożywek M4 i M7. Wszystkie trzy roztwory witamin łączy się, by otrzymać jeden roztwór podstawowy witamin

| | Ilość (mg) dopełniana do 1 litra wodą dejonizowaną (mg) | Ilość (ml/l) roztworu podstawowego witamin dodawanego w celu przygotowania pożywek M4 i M7 | Końcowe stężenia (mg/l) w roztworach testowych pożywek M4 i M7 |
|------------------------|---|--|--|
| Hydrochlorek tiaminy | 750 | 0,1 | 0,075 |
| Cyjanokobalamina (B12) | 10 | 0,1 | 0,0010 |
| Biotyna | 7,5 | 0,1 | 0,00075 |

BIBLIOGRAFIA

Elenđt, B.P. (1990). Selenium Deficiency in Crustacean. *Protoptasma* 154: 25–33.

Elenđt, B.P. i W.-R. Bias (1990). Trace Nutrient Deficiency in *Daphnia magna* Cultured in Standard Medium for Toxicity Testing. Effects on the Optimization of Culture Conditions on Life History Parameters of *D. magna*. *Water Research* 24 (9): 1157–1167.

Dodatek 3

PRZYGOTOWANIE OSADU PREPAROWANEGO

Skład osadu

Skład osadu preparowanego powinien być następujący:

| Składnik | Właściwości | % suchej masy osadu |
|-------------------|--|---------------------|
| Torf | Torf z rozkładu mchu torfowca (<i>Sphagnum</i>), w miarę możliwości o wartości pH równej 5,5–6,0, bez widocznych pozostałości roślin, drobno zmielony (wielkość cząstek ≤ 1 mm), suszony powietrzem | 4–5 |
| Piasek kwarcowy | Wielkość ziaren: > 50 % cząstek powinna mieścić się w przedziale 50–200 μm . | 75–76 |
| Glinka kaolinowa | Zawartość kaolinitu ≥ 30 % | 20 |
| Węgiel organiczny | Skorygowana przez dodanie torfu i piasku | 2 ($\pm 0,5$) |
| Węglan wapnia | CaCO_3 , sproszkowany, chemicznie czysty | 0,05–0,1 |
| Woda | Przewodność właściwa ≤ 10 $\mu\text{S}/\text{cm}$ | 30–50 |

Przygotowanie

Torf suszy się powietrzem i mieli na drobny proszek. Zawiesinę wymaganej ilości proszku torfowego w wodzie dejonizowanej przygotowuje się z użyciem wysokosprawnego urządzenia do homogenizacji. Wartość pH zawiesiny koryguje się z użyciem CaCO_3 do poziomu $5,5 \pm 0,5$. W celu ustabilizowania pH i komponentu mikrobiologicznego zawiesinę kondycjonuje się przez co najmniej dwa dni w temperaturze 20 ± 2 °C, delikatnie ją mieszając. Ponownie mierzy się pH, którego wartość powinna wynosić $6,0 \pm 0,5$. Następnie zawiesinę torfową miesza się z innymi składnikami (piaskiem i gliną kaolinową) oraz wodą dejonizowaną, aby otrzymać jednorodny osad z zawartością wody w przedziale 30–50 procent suchej masy osadu. Wartość pH końcowej mieszaniny ponownie mierzy się i koryguje w miarę potrzeby za pomocą CaCO_3 do poziomu 6,5 do 7,5. Próbkę osadu pobiera się, aby określić suchą masę i zawartość węgla organicznego. Następnie przed ich wykorzystaniem w badaniu toksyczności dla ochotkowatych zaleca się, by osad preparowany kondycjonować przez siedem dni w tych samych warunkach, jakie panować będą następnie podczas badania.

Przechowywanie

Suche składniki do przygotowywania osadu sztucznego mogą być przechowywane w suchym i chłodnym miejscu w temperaturze pokojowej. Nie powinno się przechowywać (mokrego) osadu preparowanego przed jego użyciem w badaniu. Osad należy wykorzystać natychmiast po 7-dniowym okresie kondycjonowania, kończącym proces jego przygotowania.

BIBLIOGRAFIA

Rozdział C.8 niniejszego załącznika. Toksyczność dla dżdżownic.

Meller M, Egeler P, Rombke J, Schallnass H, Nagel R, Streit B (1998). Short-term Toxicity of Lindane, Hexachlorobenzene and Copper Sulfate on Tubificid Sludgeworms (*Oligochaeta*) in Artificial Media. *Ecotox. and Environ. Safety* 39: 10–20.

Dodatek 4

Właściwości chemiczne dopuszczalnej wody do rozcieńczenia

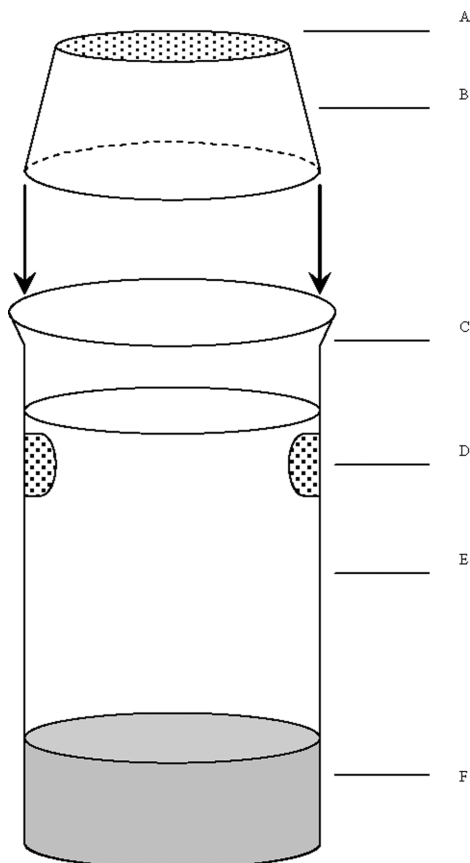
| Substancja | Stężenia |
|--|----------------|
| Cząstki stałe | < 20 mg/l |
| Całkowity węgiel organiczny | < 2 mg/l |
| Niejonizowany amoniak | < 1 µg/l |
| Twardość w przeliczeniu na CaCO ₃ | < 400 mg/l (*) |
| Chlor resztkowy | < 10 µg/l |
| Całkowita zawartość pestycydów fosforoorganicznych | < 50 ng/l |
| Całkowita zawartość pestycydów chloroorganicznych plus polichlorowanych bifenyli | < 50 ng/l |
| Całkowity chlor organiczny | < 25 ng/l |

(*) Należy jednak pamiętać, że jeżeli podejrzewa się interakcję między jonami powodującymi twardość wody a substancją badaną, powinna być stosowana woda o mniejszej twardości (a zatem w takim przypadku nie wolno używać pożywki Elencta M4).

Dodatek 5

Wytyczne dotyczące monitorowania wylęgu larw ochołkowatych

Na szklanych zlewkach do badania umieszczono pułapki na wylęgnięte kuczmany. Pułapki te potrzebne są od 20 dnia badania do zakończenia badania. Poniżej przedstawiono rysunek przedstawiający przykładową pułapkę:



- | | |
|----------------------------------|---------------------------------------|
| A: siatka nylonowa | D: osiatkowane otwory do wymiany wody |
| B: odwrócone kubeczki plastikowe | E: woda |
| C: zlewka do badania bez dzióbka | F: osad |

C.28. BADANIE TOKSYCZNOŚCI W UKŁADZIE OSAD-WODA NA OCHOTKOWATYCH Z WYKORZYSTANIEM WZBOGACONEJ WODY

WPROWADZENIE

- Niniejsza metoda badawcza jest równoważna metodzie opisanej w dotyczącej badań wytycznej OECD nr 219 (OECD TG 219) (2004). Niniejszą metodą badawczą zaprojektowano, by ocenić skutki przedłużonego narażenia na działanie chemikaliów na żyjących w osadach larw *Chironomus* sp., należących do rzędu słodkowodnych muchówek. Jest ona oparta głównie na wytycznych BBA dotyczących układu badawczego osad-woda z użyciem sztucznej gleby oraz na scenariuszu narażenia w słupie wody (1). Uwzględnia się w niej również protokoły badania toksyczności obowiązujące dla *Chironomus riparius* i *Chironomus tentans*, które opracowano w Europie i Ameryce Płn. (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) i potwierdzono w badaniu międzylaboratoryjnym (1) (6) (9). Można także wykorzystywać inne dobrze udokumentowane gatunki ochołkowatych, np. *Chironomus yoshimatsui* (10) (11).
- Scenariusz narażenia stosowany w tej metodzie badawczej polega na wzbogacaniu wody substancją badaną. Wybór odpowiedniego scenariusza narażenia zależy od zamierzonego zastosowania badania. Scenariusz narażenia w wodzie, polegający na wzbogacaniu słupa wody, służy do symulowania znoszenia cieczy roboczej w przypadku pestycydów i obejmuje początkowy szczyt stężenia w wodzie porowej. Jest on również przydatny w odniesieniu do innych rodzajów narażenia (w tym wycieków chemicznych), z wyjątkiem procesów akumulacji trwających dłużej niż okres badania.

3. Substancje, które należy przebadać pod kątem organizmów żyjących w osadach, zwykle pozostają w tym układzie przez długi czas. Organizmy żyjące w osadach mogą być narażane na działanie substancji kilkoma drogami. Względne znaczenie danej drogi narażenia i czas, jaki jest potrzebny, by przyczyniła się ona do ogólnych skutków toksycznych, zależy od fizykochemicznych właściwości danej substancji chemicznej. W przypadku substancji silnie adsorbujących (np. substancji o $\log K_{ow} > 5$) lub w przypadku substancji tworzących wiązanie kowalencyjne z osadami znaczącą drogą narażenia może być przyjmowanie zanieczyszczonego pokarmu. Aby zapobiec niedoszacowaniu toksyczności wysokolipofilowych substancji, można rozważyć zastosowanie pokarmu dodawanego do osadu przed wprowadzeniem substancji badanej. Aby uwzględnić wszelkie możliwe drogi narażenia, niniejsza metoda badawcza ukierunkowana jest na narażenie długoterminowe. Badanie trwa od 20 do 28 dni w przypadku *C. riparius* i *C. yoshimatsui*, a w przypadku *C. tentans* od 28 do 65 dni. Jeśli do określonego celu potrzebne są dane krótkoterminowe, na przykład w celu zbadania skutków działania substancji niestabilnych, po okresie dziesięciu dni można usunąć dodatkowe replikaty.
4. Mierzone punkty końcowe to całkowita liczba wylęgniętych dorosłych osobników i czas do wylęgu. Jeśli potrzebne są dodatkowe dane krótkoterminowe, zaleca się, by pomiarów przeżycia i wzrostu larw dokonywać po okresie dziesięciu dni, korzystając w stosownych przypadkach z dodatkowych replikatów.
5. Zalecane jest stosowanie osadów preparowanych. Osady preparowane są korzystniejsze od osadów naturalnych z kilku względów:
 - zmienność eksperymentalna jest ograniczona, ponieważ osad preparowany stanowi odtwarzalną »zestandaryzowaną matrycę«, tak że wyeliminowana zostaje potrzeba znalezienia źródeł niezanieczyszczonego i czystego osadu,
 - badania można rozpocząć w każdej chwili, unikając zmienności sezonowej badanego osadu, i nie jest konieczna wstępna obróbka osadu w celu usunięcia rodzimej fauny; stosowanie osadu preparowanego zmniejsza także koszty związane ze zbieraniem w terenie dostatecznych ilości osadu na potrzeby rutynowych badań,
 - zastosowanie osadu preparowanego umożliwia porównanie toksyczności i stosowną klasyfikację substancji: dane dotyczące toksyczności pochodzące z badań z osadami naturalnymi i sztucznymi były porównywalne dla kilku substancji chemicznych (2).
6. Definicje są zamieszczone w dodatku 1.

ZASADA BADANIA

7. Larwy ochotkowatych w pierwszym stadium larwalnym poddawane są działaniu substancji badanej w różnych stężeniach w układach osad-woda. Badanie rozpoczyna się od umieszczenia larw w pierwszym stadium larwalnym w zlewkach do badania zawierających układ osad-woda, a następnie wzbogaca się wodę w substancję badaną. Na końcu badania mierzy się współczynnik wylęgu i rozwoju ochotkowatych. W miarę potrzeby przeżycie i masa larw mogą być także mierzone po 10 dniach (z wykorzystaniem w stosownych przypadkach dodatkowych replikatów). Dane te analizowane są przy użyciu modelu regresji w celu oszacowania stężenia, które spowodowałoby zmniejszenie wylęgu, przeżycia lub wzrostu larw o $x\%$ (np. EC_{15} , EC_{50} itd.) albo przez testowanie hipotez statystycznych w celu określenia stężenia, przy którym nie obserwuje się szkodliwych zmian (NOEC), lub najniższego stężenia, przy którym obserwuje się szkodliwe zmiany (LOEC). To ostatnie wymaga porównania wartości zmian z wartościami kontrolnymi z użyciem badań statystycznych.

INFORMACJE NA TEMAT SUBSTANCJI BADANEJ

8. Należy znać rozpuszczalność substancji badanej w wodzie, prężność par, podział substancji w osadzie oraz jej stabilność w wodzie i osadzie, uzyskane w wyniku pomiarów lub obliczeń. Powinna być dostępna wiarygodna metoda analityczna do oznaczania ilościowego substancji badanej w osadzie, wodzie porowej i warstwie wody powyżej osadu ze znaną i udokumentowaną dokładnością oraz granicą wykrywalności. Użyteczne informacje obejmują wzór strukturalny i czystość substancji badanej. Do przydatnych informacji należą także dane dotyczące chemicznych losów substancji w środowisku (np. jej rozpraszanie, rozkład abiotyczny i biotyczny itd.). Dalsze wskazówki dotyczące badania substancji o własnościach fizykochemicznych utrudniających ich badanie podano w pozycji (12) w bibliografii.

SUBSTANCJE ODNIESIENIA

9. Substancje odniesienia mogą być okresowo badane dla zagwarantowania, że protokół i warunki badania są rzetelne. Przykłady substancji toksycznych stosowanych z powodzeniem w badaniach międzylaboratoryjnych i walidacyjnych: lindan, trifluralina, pentachlorofenol, chlorek kadmu i chlorek potasu (1) (2) (5) (6) (13).

WAŻNOŚĆ BADANIA

10. Aby badanie było ważne, obowiązują następujące warunki:
 - odsetek wylęgniętych osobników dorosłych w próbach kontrolnych musi na końcu badania być co najmniej na poziomie 70 % (1) (6),

- w naczyniach zawierających próby kontrolne wylęg osobników dorosłych *C. riparius* i *C. yoshimatsui* z larw powinien nastąpić między 12. a 23. dniem od ich wprowadzenia do naczynia; w przypadku *C. tentans* niezbędny jest okres od 20 do 65 dni,
- na końcu badania należy zmierzyć wartość pH oraz stężenie rozpuszczonego tlenu w każdym naczyniu. Stężenie tlenu powinno wynosić co najmniej 60 % wartości nasycenia powietrzem (ASV) w wybranej temperaturze, a wartość pH w warstwie wody powyżej osadu powinna we wszystkich naczyniach używanych do badania znajdować się w przedziale 6–9,
- temperatura wody nie powinna różnić się o więcej niż $\pm 1,0$ °C. Temperaturę wody można kontrolować przy użyciu pomieszczenia izotermicznego i w takim przypadku temperatura pomieszczenia powinna być potwierdzana w stosownych odstępach czasowych.

OPIS METODY

Naczynia używane do badania

11. Badanie prowadzone jest w szklanych zlewkach o pojemności 600 ml i średnicy 8 cm. Inne naczynia także mogą nadawać się do badania, powinny jednak zapewniać odpowiednią głębokość warstwy osadu i warstwy wody powyżej. Powierzchnia osadu powinna być wystarczająca, by zapewnić od 2 do 3 cm² na larwę. Stosunek głębokości warstwy osadu do warstwy wody powyżej powinien wynosić 1:4. Naczynia do badania i inne przyrządy mające kontakt z układem badawczym powinny być w całości wykonane ze szkła lub innego chemicznie obojętnego materiału (np. teflonu).

Wybór gatunków

12. Gatunkiem wykorzystywanym w badaniu powinien być w miarę możliwości *Chironomus riparius*. Odpowiedni jest także *Chironomus tentans*, ale jest trudniejszy w hodowli i wymaga dłuższego okresu badania. Można także korzystać z *Chironomus yohimatsui*. Szczegóły metod hodowli dla *Chironomus riparius* podano w dodatku 2. Informacje dotyczące warunków hodowli są także dostępne dla innych gatunków, tj. *Chironomus tentans* (4) i *Chironomus yoshimatsui* (11). Przed przeprowadzeniem badania należy potwierdzić identyfikację gatunków, ale nie jest to wymagane przed każdym badaniem, jeśli organizmy pochodzą z hodowli wewnątrzlaboratoryjnej.

Osad

13. W miarę możliwości należy stosować osad preparowany (zwany także osadem regenerowanym, sztucznym lub syntetycznym). Jeśli jednak korzysta się z osadu naturalnego, należy go scharakteryzować (co najmniej pod kątem pH, zawartości węgla organicznego, zaleca się także określenie innych parametrów, takich jak stosunek C/N i granulometria). Osad taki powinien być wolny od zanieczyszczeń i innych organizmów, które mogłyby konkurować z ochotkowatymi lub je zjadać. Zaleca się także, by przed jego wykorzystaniem w badaniu toksyczności dla ochotkowatych naturalny osad był przez siedem dni kondycjonowany w tych samych warunkach, jakie panować będą następnie podczas badania. Do wykorzystania w tym badaniu (1) (15) (16) zaleca się następujący osad preparowany oparty na sztucznej glebie stosowanej w metodzie badawczej C.8 (14):
 - a) torf 4–5 % (w przeliczeniu na suchą masę): wartość pH możliwie najbardziej zbliżona do przedziału 5,5 do 6,0; ważne jest, by stosować torf w postaci sproszkowanej, drobno zmielony (wielkość cząstek ≤ 1 mm) i suszony wyłącznie powietrzem;
 - b) glina kaolinowa 20 % (w przeliczeniu na suchą masę) (zawartość kaolinitu w miarę możliwości powyżej 30 %);
 - c) piasek kwarcowy 75–76 % (w przeliczeniu na suchą masę) (powinien przeważać drobny piasek, w którym ponad 50 % cząstek mierzy od 50 do 200 μ m);
 - d) dla uzyskania wilgotności końcowej mieszanki na poziomie od 30-50 % dodaje się wodę dejonizowaną;
 - e) w celu skorygowania pH końcowej mieszanki osadu do wartości $7,0 \pm 0,5$ dodaje się do niej chemicznie czysty węgiel wapnia (CaCO_3);
 - f) zawartość węgla organicznego w końcowej mieszance powinna wynosić 2 % ($\pm 0,5$ %) i należy ją skorygować przy użyciu odpowiednich ilości torfu i piasku, zgodnie z lit. a) i c).
14. Źródło torfu, gliny kaolinowej i piasku powinno być znane. Składniki osadu należy sprawdzić pod kątem zanieczyszczenia chemicznego (np. metalami ciężkimi, związkami chloroorganicznymi, związkami fosforoorganicznymi itp.). W dodatku 3 podano przykładowy sposób przygotowania osadu preparowanego. Dopuszczalne jest także mieszanie suchych składników, o ile wykaże się, że po dodaniu warstwy wody powyżej osadu składniki osadu się nie rozdzielają (np. nie unoszą się cząstki torfu) oraz że torf lub osad jest poddawany dostatecznemu kondycjonowaniu.

Woda

15. Jako wodę do badania można stosować każdy rodzaj wody, której charakterystyka zgodna jest z charakterystyką chemiczną wody nadającej się do rozcieńczenia, jak opisano w dodatkach 2 i 4. Do hodowli ochotkowatych i do badania może służyć każdy odpowiedni rodzaj wody, np. woda naturalna (powierzchniowa lub gruntowa), woda regenerowana (zob. dodatek 2) lub odchlorowana woda wodociągowa, pod warunkiem że ochotkowate przeżyją w niej przez okres hodowli i badania bez wykazywania oznak stresu. Na początku badania wartość pH wody do badania powinna wynosić od 6 do 9, a twardość ogółem wody w przeliczeniu na CaCO_3 nie powinna być wyższa niż 400 mg/l. Jeśli jednak podejrzewa się, że między jonami powodującymi twardość wody a substancją badaną dochodzi do interakcji, powinna być stosowana woda o mniejszej twardości (a zatem w takim przypadku nie wolno używać pożywki Elennta M4). Przez okres całego badania należy stosować ten sam rodzaj wody. Cechy jakości wody, wymienione w dodatku 4, należy mierzyć co najmniej dwa razy w roku lub ilekroć zachodzi podejrzenie, że mogły one ulec znacznej zmianie.

Roztwory podstawowe – woda wzbogacana

16. Badane stężenia oblicza się na podstawie stężeń w słupie wody, tj. w warstwie wody powyżej osadu. Roztwory testowe o wybranych stężeniach są zwykle przygotowywane przez rozcieńczenie roztworu podstawowego. Zalecane jest przygotowanie roztworów podstawowych przez rozpuszczenie substancji badanej w pożywce. W niektórych przypadkach wymagane może być stosowanie rozpuszczalników lub środków dyspergujących w celu uzyskania odpowiednio stężonego roztworu podstawowego. Przykładami odpowiednich rozpuszczalników są aceton, etanol, metanol, eter monoetylowy glikolu etylenowego, eter dimetylowy glikolu etylenowego, dimetyloformamid i glikol trójetylenowy. Dopuszczalne środki dyspergujące to kremofor RH40, Tween 80, metylceluloza 0,01 % i HCO-40. Stężenie środka rozpuszczającego w końcowej pożywce powinno być minimalne (tj. $\leq 0,1$ ml/l) i jednakowe we wszystkich zabiegach. Gdy stosuje się środki rozpuszczające, nie mogą one mieć znaczącego wpływu na przeżycie ani widocznego szkodliwego działania na larwy ochotkowatych, wykazanego w doświadczeniu kontrolnym z rozpuszczalnikiem. Należy jednak dołożyć wszelkich starań, aby uniknąć użycia takich substancji.

PROJEKT BADANIA

17. Projekt badania obejmuje dobór liczby badanych stężeń i ich zróżnicowanie, liczby naczyń zawierających dane stężenie substancji i liczby larw na jedno naczynie. Opisano projekty dotyczące punktowego oszacowania wartości EC, oszacowania wartości NOEC i przeprowadzenia badania granicznego. Zaleca się raczej analizę regresji niż podejście oparte na badaniu hipotez.

Projekt analizy regresyjnej

18. Stężenie efektywne (np. EC_{15} , EC_{50}) i zakres stężeń, powyżej którego skutki działania substancji badanej stają się przedmiotem zainteresowania, należy wyskalować z zastosowaniem stężeń ujętych w badaniu. Na ogół dokładność, a zwłaszcza ważność, z jakimi można dokonać oceny stężeń efektywnych (EC_x), są wyższe, gdy stężenie efektywne mieści się w zakresie badanych stężeń. Należy unikać ekstrapolowania wyników znacznie poniżej najniższego stężenia dającego wynik dodatni lub powyżej najwyższego stężenia. Wstępne badanie ustalające zakres jest pomocne przy wyborze zakresu stężeń do zastosowania (zob. pkt 27).

19. Jeśli trzeba oszacować EC_x , należy zbadać co najmniej pięć stężeń i trzy replikaty dla każdego stężenia. W każdym przypadku zaleca się stosowanie dostatecznych stężeń substancji badanej, aby umożliwić dobre oszacowanie parametrów modelu. Współczynnik odstępów między stężeniami nie powinien być większy niż dwa (z wyjątkiem przypadków, gdy krzywa dawka-odpowiedź ma łagodny przebieg). Liczba replikatów przy każdym podaniu dawki substancji badanej może być zmniejszona, jeśli zwiększy się liczbę stężeń substancji badanej dających różne odpowiedzi. Zwiększenie liczby replikatów lub zmniejszenie wielkości odstępów między badanymi stężeniami zwykle prowadzi do zwężenia przedziałów ufności dla danego badania. Jeśli celem jest oszacowanie przeżycia i wzrostu larw w okresie 10 dni, wymagane są dodatkowe replikaty.

Projekt dotyczący oszacowania NOEC/LOEC

20. Jeśli celem jest oszacowanie wartości LOEC/NOEC, należy zastosować pięć stężeń substancji badanej z co najmniej czterema replikatami, a współczynnik odstępów między stężeniami nie powinien być większy niż dwa. Liczba replikatów powinna być na tyle duża, by zapewnić odpowiednią moc statystyczną dla wykrycia 20 % różnicy z próbą kontrolną przy istotności wynoszącej 5 % ($p = 0,05$). W przypadku współczynnika rozwoju zwykle stosowna jest analiza wariancji (ANOVA), np. badanie Dunnetta i badanie Williamsa (17) (18) (19) (20). W przypadku współczynnika wylęgu można stosować test Cochran-Armitage'a, test dokładny Fishera (z korektą Bonferroniego) lub test Mantela-Haenszela.

Badanie graniczne

21. Jeśli we wstępnym badaniu ustalającym zakres nie zaobserwowano żadnych zmian, można przeprowadzić badanie graniczne (jedno stężenie badane i jedna próba kontrolna). Celem badania granicznego jest pokazanie, że toksyczność substancji badanej jest większa niż zbadane stężenie graniczne. W ramach niniejszej metody badawczej nie można zaproponować zalecanego stężenia; kwestię tę pozostawia się uznaniu organów regulacyjnych. Zazwyczaj koniecznych jest co najmniej 6 replikatów zarówno dla próby poddawanej działaniu substancji, jak i dla próby kontrolnej. Należy wykazać odpowiednią moc statystyczną, która pozwala wykryć 20 % różnicę w porównaniu z próbą kontrolną przy 5 % poziomie istotności ($p = 0,05$). Przy odpowiedniej metrycznej (współczynnik rozwoju i masa) odpowiednią metodą statystyczną jest test t-Studenta, jeśli dane spełniają warunki tego testu (normalność rozkładu zmiennych, jednorodność wariancji). Jeśli te warunki nie są spełnione, można zastosować test t-Studenta dla nierównych wariancji lub test nieparametryczny, np. test Manna-Whitneya-Wilcoxon. W przypadku współczynnika wylęgu odpowiedni jest test dokładny Fishera.

PROCEDURA

Warunki narażenia na działanie substancji*Przygotowanie układu woda wzbogacona-osad*

22. Do naczyń do badania dodaje się odpowiednie ilości preparowanego osadu (zob. pkt 13–14 oraz dodatek 3), aby powstała warstwa o grubości co najmniej 1,5 cm. Wodę dodaje się do głębokości 6 cm (zob. pkt 15). Stosunek głębokości warstwy osadu do warstwy wody nie powinien przekraczać 1:4, a warstwa osadu nie powinna być wyższa niż 3 cm. Przed dodaniem organizmów badanych układ osad-woda należy delikatnie napowietrzać przez siedem dni (zob. pkt 14 oraz dodatek 3). Podczas dodawania badanej wody do słupa wody nad osadem, aby uniknąć oddzielenia składników osadu i ponownego zawieszenia w wodzie drobnoziarnistego materiału, osad na czas zalewania można nakryć plastikowym krążkiem, a krążek następnie od razu usunąć. Właściwe może być także zastosowanie innych przyrządów.
23. Naczynia do badania powinny być przykryte (np. szklanymi płytkami). W razie konieczności w czasie badania poziom wody uzupełnia się do pierwotnej objętości, aby wyrównać brak spowodowany jej parowaniem. Należy w tym celu używać wody destylowanej lub dejonizowanej, aby zapobiec odkładaniu się soli.

Dodanie organizmów badanych

24. Na cztery-pięć dni przed umieszczeniem organizmów badanych w naczyniach używanych do badania pakiety jaj należy wyjąć z hodowli i umieścić w małych naczyniach w pożywce hodowlanej. Można w tym celu zastosować pożywkę wykorzystywaną w hodowli podstawowej lub pożywkę świeżo przygotowaną. Jeśli stosowana jest ta ostatnia, do pożywki hodowlanej należy dodać niewielką ilość pokarmu, np. zielenice lub kilka kropel filtratu z drobno zmielonej zawiesiny pokarmu w płatkach dla ryb (zob. dodatek 2). Należy korzystać wyłącznie ze świeżo złożonych pakietów jaj. Wylęg larw zaczyna się przeważnie kilka dni po złożeniu pakietów jaj (2 do 3 dni w przypadku *Chironomus riparius* w temperaturze 20 °C oraz 1 do 4 dni w przypadku *Chironomus tentans* w temperaturze 23 °C i *Chironomus yoshimatsui* w temperaturze 25 °C), a wzrost larw następuje w czterech stadiach larwalnych, przy czym każde z nich trwa od 4 do 8 dni. Do badania należy stosować larwy w pierwszym stadium larwalnym (2–3 lub 1–4 dni po wylęgu). Stadium larwalne kuczmanów można sprawdzić, stosując pomiar szerokości puszki głowowej (6).
25. Dwadzieścia larw w pierwszym stadium larwalnym przydziela się losowo do każdego naczynia doświadczalnego zawierającego osad wzbogacony i wodę przy użyciu tępo zakończony pipety. Po wprowadzeniu larw do naczyń należy zatrzymać napowietrzanie wody i nie uruchamiać go przez dobę po ich wprowadzeniu (zob. pkt 24 i 32). Zgodnie z zastosowanym projektem badania (zob. pkt 19 i 20) w celu oszacowania punktowego EC należy zastosować co najmniej 60 larw na stężenie, a w celu oznaczenia wartości NOEC – 80 larw.
26. Dwadzieścia cztery godziny po dodaniu larw słup wody powyżej osadu wzbogacany jest w substancję badaną i ponownie zapewniane jest delikatne napowietrzanie. Małe ilości roztworów substancji badanej wprowadza się pod powierzchnię wody za pomocą pipety. Wodę powyżej osadu należy następnie ostrożnie zamieszać, tak aby go nie poruszyć.

Badane stężenia

27. Badanie ustalające zakres może być przydatne do określenia zakresu stężeń dla ostatecznego badania. W tym celu stosuje się szereg roztworów o znacznie różniących się od siebie stężeniach substancji badanej. Aby zapewnić tę samą gęstość powierzchni na ochotkowate, co stosowana w ostatecznym badaniu, ochotkowate poddaje się narażeniu na każde stężenie substancji badanej przez okres pozwalający oszacować odpowiednie jej stężenie badane i nie wymagane są replikaty.
28. Decyzje dotyczące stężeń substancji badanej w ostatecznym badaniu podejmuje się w oparciu o wynik badania ustalającego zakres. Jak opisano w pkt 18 do 20, należy zastosować i wybrać co najmniej pięć stężeń.

Próby kontrolne

29. Naczynia zawierające próby kontrolne bez substancji badanej, ale zawierające osad, powinny być uwzględnione w badaniu z odpowiednią liczbą replikatów (zob. pkt 19 i 20). Jeśli do wprowadzenia substancji badanej został użyty rozpuszczalnik (zob. pkt 16), należy dodać próbę kontrolną zawierającą osad z rozpuszczalnikiem.

Układ badawczy

30. Stosowane są układy statyczne. W wyjątkowych przypadkach, na przykład gdy określone w specyfikacjach cechy jakości wody staną się nieodpowiednie dla organizmu badanego lub naruszą równowagę chemiczną (np. poziomy rozpuszczonego tlenu spadną zbyt nisko, stężenie produktów wydalania za bardzo wzrośnie lub nastąpi uwalnianie minerałów z osadu, które wpłynie na wartość pH lub twardość wody), można stosować układy półstatyczne lub przepływowe z okresowym lub stałym odnawianiem wody powyżej osadu. Inne metody poprawy jakości wody powyżej osadu, np. napowietrzanie, zwykle jednak wystarczają i należy w miarę możliwości z nich korzystać.

Pokarm

- Larwy trzeba karmić, w miarę możliwości codziennie lub co najmniej trzy razy w tygodniu. Odpowiedni do karmienia młodych larw przez pierwsze 10 dni wydaje się pokarm dla ryb (zawiesina w wodzie lub drobno zmielony pokarm, np. TetraMin lub TetraPhyll, zob. szczegółowe informacje w dodatku 2) w ilości 0,25–0,5 mg (0,35–0,5 mg w przypadku *C. yoshimatsui*) na larwę dziennie. Starsze larwy mogą potrzebować nieco więcej pokarmu: 0,5–1 mg na larwę na dzień powinno być wystarczającą ilością przez pozostałą część badania. Jeśli obserwuje się wzrost grzybów lub śmiertelność w próbach kontrolnych, należy wówczas we wszystkich próbach kontrolnych i doświadczalnych ograniczyć i kontrolować racje żywieniowe. Jeśli nie można powstrzymać rozwoju grzybów, należy powtórzyć badanie. Przy badaniu substancji silnie adsorbujących (np. o $\log K_{ow} > 5$) lub w przypadku substancji tworzących wiązanie kowalencyjne z osadem ilość pokarmu niezbędną do zapewnienia przeżycia i naturalnego wzrostu organizmów można dodać do osadu preparowanego przed okresem stabilizacji. W tym celu zamiast pokarmu dla ryb należy stosować surowiec roślinny, np. dodatek 0,5 % (w przeliczeniu na suchą masę) drobno zmielonych liści np. pokrzywy zwyczajnej (*Urtica dioica*), morwy białej (*Morus alba*), koniczyny białej (*Trifolium repens*), szpinaku (*Spinacia oleracea*), można też użyć innego surowca roślinnego (produktu *Cerophyl* lub alfa-celulozy).

Warunki inkubacji

- W miarę możliwości w ciągu 24 godzin od wprowadzenia larw należy zapewnić delikatne napowietrzanie warstwy wody powyżej osadu w naczyniach do badania, a następnie kontynuować je przez cały okres badania (należy dopilnować, by stężenie rozpuszczonego tlenu nie spadło poniżej 60 % ASV). Napowietrzanie prowadzone jest z użyciem szklanej pipety Pasteura przytwierdzonej 2–3 cm nad warstwą osadu (tj. w ilości jednego lub kilku bąbli powietrza/sek.). Przy badaniu lotnych chemikaliów można rozważyć nienapowietrzanie układu osad-woda.
- Badanie przeprowadza się w stałej temperaturze 20 °C (± 2 °C). Zalecane temperatury w przypadku *C. tentans* i *C. yoshimatsui* to odpowiednio 23 °C i 25 °C (± 2 °C). Stosuje się 16-godzinny fotoperiod, a natężenie światła powinno wynosić od 500 do 1 000 luksów.

Czas trwania narażenia

- Czas trwania narażenia rozpoczyna się od wprowadzenia larw do naczyń z próbą wzbogaconą i naczyń zawierających próby kontrolne. Maksymalny czas trwania narażenia wynosi 28 dni w przypadku *C. riparius* i *C. yoshimatsui*, a w przypadku *C. tentans* 65 dni. Jeśli kuczmany wylęgną się wcześniej, badanie można zakończyć po co najmniej pięciu dniach od wylęgu ostatniego dorosłego osobnika w próbie kontrolnej.

OBSERWACJE

Wylęg osobników dorosłych

- Należy określić czas rozwoju i całkowitą liczbę w pełni wylęgniętych samców i samic kuczmanów. Samce łatwo zidentyfikować dzięki ich pierzastym czułkom.
- Naczynia do badania należy obserwować co najmniej trzy razy w tygodniu w celu wzrokowej oceny ewentualnego nieprawidłowego zachowania (np. porzucanie osadu, nietypowy sposób pływania) w porównaniu z próbą kontrolną. W okresie spodziewanego wylęgu kuczmanów konieczne jest codzienne ich zliczanie. Pleć i liczbę w pełni wylęgniętych kuczmanów należy zapisywać codziennie. Po identyfikacji kuczmany usuwane są z naczyń. Pakiety jaj złożone przed zakończeniem badania należy odnotować, a następnie usunąć, by zapobiec ponownemu wprowadzeniu larw do osadu. Należy także odnotować liczbę widocznych poczwerek, z których nie wylęgły się kuczmany. Wytyczne dotyczące pomiaru wylęgu zawarte są w dodatku 5.

Wzrost i przeżycie

- Jeśli mają być dostarczone dane dotyczące 10-dniowego przeżycia i wzrostu larw, należy na początku włączyć do badania dodatkowe naczynia, by mogły być w tym celu wykorzystane. Aby zebrać larwy, osad z tych dodatkowych naczyń należy przesiać, używając sita 250 μm . Kryteriami zgonu są nieruchomość lub brak reakcji na bodziec mechaniczny. Larwy nieodzyskane należy także liczyć jako martwe (larwy, które padły na początku badania, mogły zostać rozłożone przez drobnoustroje). Należy określić suchą masę (bez popiołu) larw pozostałych przy życiu na każde naczynie do badania i obliczyć średnią suchą masę pojedynczej larwy na każde naczynie. Przydatne jest określenie, w którym stadium larwalnym znajdują się larwy pozostałe przy życiu; w tym celu można stosować pomiar puszki głowowej każdego osobnika.

Pomiary analityczne

Stężenie substancji badanej

- Na początku i na końcu badania trzeba przeanalizować co najmniej próbki wody z warstwy powyżej osadu, wody porowej i osadu (najlepiej godzinę po wprowadzeniu substancji badanej), przy najwyższym stężeniu i przy niższym stężeniu. Takie oznaczenie stężenia substancji badanej daje wiedzę na temat zachowania/podziału substancji badanej w układzie woda-osad. Pobieranie próbek osadu na początku badania może wpływać na układ badawczy (np. poprzez usunięcie badanych larw), a zatem do wykonywania oznaczeń analitycznych na

początku i w trakcie badania należy w stosownych przypadkach używać dodatkowych naczyń do badania (zob. pkt 39). Pomiar osadu mogą nie być konieczne, jeśli podział substancji badanej między wodą i osadem został wyraźnie określony w badaniu wody/osadu w porównywalnych warunkach (np. stosunek osadu do wody, rodzaj zastosowania, zawartość węgla organicznego w osadzie).

39. Gdy dokonuje się pomiarów pośrednich (np. w 7. dniu) lub jeśli do analizy potrzeba dużych próbek, których nie można pobrać z naczyń do badania bez wpływania na układ badawczy, należy dokonać oznaczeń analitycznych na próbkach pochodzących z dodatkowych naczyń do badania przygotowanych w ten sam sposób (zawierających także organizmy badane), ale nie wykorzystywanych do obserwacji biologicznych.
40. Aby oddzielić wodę porową, zaleca się odwirowanie osadu np. przy 10 000 g w temp. 4 °C przez 30 min. Jeśli jednak substancja badana nie adsorbuje się na filtrze, dopuszczalna jest też filtracja. W niektórych przypadkach zanalizowanie stężeń w wodzie porowej może nie być możliwe, ponieważ wielkość próbki jest zbyt mała.

Parametry fizykochemiczne

41. Wartość pH, stężenie rozpuszczonego tlenu w wodzie do badania i temperatura w naczyniach do badania powinny być odpowiednio mierzone (zob. pkt 10). Twardość i zawartość amoniaku należy zmierzyć w próbach kontrolnych i w jednym naczyniu do badania przy najwyższym stężeniu na początku i na końcu badania.

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Opracowanie wyników

42. Celem badania jest określenie wpływu substancji badanej na współczynnik rozwoju i całkowitą liczbę w pełni wylęgniętych samic i samców kuczmanów lub, w przypadku badań 10-dniowych, skutków dla przeżycia i masy larw. Jeśli nie ma wskazań dotyczących statystycznie istotnych różnic we wrażliwości osobników każdej płci, wyniki dotyczące osobników męskich i żeńskich mogą zostać połączone do celów analizy statystycznej. Różnice we wrażliwości między płciami można oszacować statystycznie z wykorzystaniem np. tablicy rozkładu chi-kwadrat χ^2 -r x 2. W razie konieczności przeżycie larw i średnią suchą masę larwy na naczyniu należy określić po 10 dniach.
43. Wartości stężeń powodujące zmiany, wyrażone jako stężenia w wodzie powyżej osadu, należy obliczyć w miarę możliwości w oparciu o zmierzone stężenia na początku badania (zob. pkt 38).
44. Aby obliczyć oszacowanie punktowe dla EC₅₀ i innych EC_x, jako prawdziwe replikaty można wykorzystywać dane statystyczne dotyczące poszczególnych naczyń. Przy wyliczaniu przedziału ufności dla EC_x należy uwzględnić zmienność między naczyniami lub należy wykazać, że zmienność ta jest tak niewielka, że można ją pominąć. Jeżeli model został dopasowany przy użyciu metody najmniejszych kwadratów, do danych statystycznych dotyczących poszczególnych naczyń należy zastosować przekształcenie, aby poprawić jednorodność wariancji. Wartości EC_x należy jednak liczyć po przekształceniu odpowiedzi z powrotem do wartości pierwotnej.
45. W przypadku gdy analiza statystyczna ma na celu określenie wartości NOEC/LOEC przez zastosowanie badania hipotezy statystycznej, należy wziąć pod uwagę zmienność między naczyniami, np. przez zastosowanie zagnieżdżonej analizy wariancji. Ewentualnie w przypadkach, w których występują naruszenia zwykłych założeń analizy wariancji, odpowiednie mogą być bardziej odporne testy (21).

Współczynnik wylęgu

46. W przypadku gdy oczekuje się monotonicznej zależności dawka-odpowiedź, a dane te są spójne z tym oczekiwaniem, współczynnik wylęgu, które są danymi dwuwartościowymi, można zanalizować z użyciem testu Cochran-Armitage'a stosowanego na zasadzie krokowej wstecznej. W innym przypadku można zastosować test dokładny Fishera lub test Mantela-Haenszela z granicznym poziomem istotności skorygowanym metodą Bonferroni-Holma. Jeśli są dowody na większą zmienność między replikatami w ramach tego samego stężenia niż wskazywałby na to rozkład dwumianowy (co określa się często jako zmienność większą niż zmienność w rozkładzie dwumianowym), wówczas należy zastosować odporny test Cochran-Armitage'a lub test dokładny Fishera, tak jak proponuje się w pozycji (21) w bibliografii.
47. Suma kuczmanów wylęgniętych na każde naczynie, n_e , jest określana i dzielona przez liczbę wprowadzonych larw, n_a :

$$ER = \frac{n_e}{n_a}$$

gdzie:

ER = współczynnik wylęgu,

n_e = liczba wylęgniętych kuczmanów na każde naczynie,

n_a = liczba wprowadzonych larw na każde naczynie.

48. Najwłaściwszą alternatywą w przypadku dużych próbek, w których występuje wariancja większa niż wariancja w rozkładzie dwumianowym, jest traktowanie współczynnika wylęgu jako odpowiedzi ciągłej i stosowanie takich procedur jak test Williamsa, gdy oczekuje się monotonicznej zależności dawka-odpowiedź i oczekiwanie to jest zgodne z danymi dotyczącymi współczynnika wylęgu. Jeśli założenie dotyczące monotoniczności nie jest spełnione, odpowiedni byłby test Dunnetta. Uznaje się, że próbka jest duża, gdy zarówno liczba wylęgniętych kuczmanów, jak i liczba larw, z których się one nie wylęgły, przekracza pięć na każde naczynie stanowiące replikat.
49. Aby zastosować metody analizy wariancji, wartości współczynnika wylęgu należy najpierw przekształcić, stosując przekształcenie pierwiastkowe i arcsin lub przekształcenie Freemana-Tukeya w celu otrzymania przybliżonego normalnego rozkładu i wyrównania wariancji. Przy użyciu częstości bezwzględnej można zastosować test Cochran-Armitage'a, test dokładny Fishera (z korektą Bonferroniego) lub test Mantela-Haenszela. Przekształcenie pierwiastkowe i arcsin stosuje się przez wyznaczenie funkcji odwrotnej względem sinusa (\sin^{-1}) pierwiastka współczynnika wylęgu.
50. W przypadku współczynników wylęgu wartości EC_x oblicza się, stosując analizę regresji (lub np. analizę probitową (22), logitową, analizę Weibulla, odpowiednie oprogramowanie komercyjne itd.). Jeśli analiza regresji zawodzi (np. w przypadku gdy występują mniej niż dwie częściowe odpowiedzi), stosuje się inne metody nieparametryczne, takie jak średnia krocząca lub prosta interpolacja.

Współczynnik rozwoju

51. Średnia czasu rozwoju to średni czas od wprowadzenia larw (dzień 0 badania) do wylęgu kuczmanów tworzących kohortę badaną (w celu policzenia rzeczywistego czasu rozwoju należy uwzględnić wiek larw w chwili wprowadzenia). Współczynnik rozwoju stanowi odwrotność czasu rozwoju (jednostka: 1/dzień) i przedstawia tę część rozwoju larwy, która następuje każdego dnia. Do celów oceny omawianych badań dotyczących toksyczności w osadzie preferowany jest współczynnik rozwoju, jako że jego wariancja jest mniejsza, jest bardziej jednorodny i bliższy normalnemu rozkładowi w porównaniu z czasem rozwoju. Dlatego silne metody parametryczne badania stosować można raczej w odniesieniu do współczynnika rozwoju niż do czasu rozwoju. Dla współczynnika rozwoju jako odpowiedzi ciągłej można szacować wartości EC_x , stosując analizę regresji (zob. np. (23) (24)).
52. Do celów poniższych badań statystycznych przyjmuje się, że liczba kuczmanów zaobserwowanych w dniu kontroli x wylęgła się w średniej arytmetycznej odstępu czasu między dniem x a dniem $x-1$ ($1 =$ długość odstępu czasowego między kontrolami, zwykle 1 dzień). Średnia arytmetyczna współczynnika rozwoju na każde naczynie (\bar{x}) liczona jest według następującego wzoru:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^m f_i x_i}{n_e}$$

gdzie:

- \bar{x} : średnia arytmetyczna współczynnika rozwoju na każde naczynie,
- i : wskaźnik odstępu czasowego między kontrolami,
- m : maksymalna liczba odstępów czasowych między kontrolami,
- f_i : liczba kuczmanów wylęgniętych w odstępie czasowym między kontrolami i ,
- n_e : całkowita liczba kuczmanów wylęgniętych na koniec doświadczenia, ($= \sum f_i$)
- x_i : współczynnik rozwoju kuczmanów wylęgniętych w odstępie czasowym między kontrolami i .

$$x_i = 1 / \left(\text{day}_i - \frac{l_i}{2} \right)$$

gdzie:

- day_i : dzień kontroli (dni od wprowadzenia),
- l_i : długość odstępu czasowego między kontrolami i (w dniach, zwykle 1 dzień).

Sprawozdanie z badania

53. Sprawozdanie z badania musi zawierać co najmniej następujące informacje:

Substancja badana

- cechy fizyczne i w stosownych przypadkach właściwości fizykochemiczne (rozpuszczalność w wodzie, prężność par, współczynnik podziału w glebie (lub w osadzie, jeśli jest dostępny), stabilność w wodzie itd.),
- dane identyfikacyjne substancji chemicznej (nazwa zwyczajowa, nazwa chemiczna, numer CAS, wzór strukturalny), w tym czystość i metoda analityczna oznaczania ilościowego substancji badanej.

Badany gatunek

- zwierzęta wykorzystane w badaniu: gatunek, nazwa naukowa, źródło organizmów i warunki hodowli,
- informacje dotyczące postępowania z pakietami jaj i larwami,
- wiek zwierząt badanych w chwili umieszczenia w naczyniu do badania.

Warunki badania

- użyty osad, tj. osad naturalny lub preparowany,
- w przypadku osadu naturalnego – lokalizacja i opis miejsca pobrania próbki osadu, w tym, jeśli to możliwe, historia zanieczyszczenia; charakterystyka: pH, zawartość węgla organicznego, stosunek C/N i granulometria (w stosownych przypadkach),
- przygotowanie osadu preparowanego: składniki i charakterystyka (zawartość węgla organicznego, pH, wilgotność itd. na początku badania),
- przygotowanie wody do badania (jeśli stosowana jest woda regenerowana) i jej charakterystyka (stężenie tlenu, pH, przewodność właściwa, twardość itd. na początku badania),
- głębokość warstwy osadu i warstwy wody powyżej,
- objętość warstwy wody powyżej osadu i wody porowej; masa mokrego osadu z wodą porową i bez niej,
- naczynia do badania (materiał i wielkość),
- metody przygotowania roztworu podstawowego i badanych stężeń,
- wprowadzenie substancji badanej: użyte stężenia, liczba replikatów i użyty rozpuszczalnik, jeśli go zastosowano,
- warunki inkubacji: temperatura, cykl i natężenie oświetlenia, napowietrzanie (częstotliwość i natężenie),
- szczegółowe informacje o żywieniu, w tym rodzaj pokarmu, przygotowanie, schemat żywienia i ilość pokarmu.

Wyniki

- nominalne stężenia badane, zmierzone stężenia badane i wyniki wszystkich analiz ustalających stężenia substancji badanej w naczyniach do badań,
- jakość wody w naczyniach do badania, tj. pH, temperatura, rozpuszczony tlen, twardość i zawartość amoniaku,
- uzupełnienie wyparowanej wody do badania, jeśli nastąpiło,
- liczbę wylęgniętych męskich i żeńskich kuczmanów na każde naczynie na każdy dzień,
- liczbę larw, z których nie wylęgły się kuczmany, na każde naczynie,
- w stosownych przypadkach średnia sucha masa larw na każde naczynie do badania i na każde stadium larwalne,
- odsetek wylęgniętych kuczmanów na każdy replikat i na każde stężenie substancji badanej (samice i samce kuczmanów łącznie),
- średni współczynnik rozwoju w pełni wylęgniętych kuczmanów na każdy replikat i współczynnik poddania działaniu substancji badanej (samice i samce kuczmanów łącznie),
- oszacowania toksycznych punktów końcowych, np. EC_x (i powiązane przedziały ufności), wartość stężenia, przy którym nie obserwuje się szkodliwych zmian (NOEC), lub najniższe stężenie, przy którym obserwuje się szkodliwe zmiany (LOEC) oraz metody statystyczne użyte w celu ich określenia,
- omówienie wyników, w tym ewentualny wpływ na wynik badania będący skutkiem odstępstw od niniejszej metody badawczej.

BIBLIOGRAFIA:

- (1) BBA (1995). Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*. Development and validation of a new test system. M. Strelöke i H. Köpp (red.). Berlin 1995.
- (2) Fleming R i in. (1994). Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances. Sprawozdanie końcowe dla Komisji Europejskiej. Nr sprawozdania: EC 3738. Sierpień 1994. WRc, Zjednoczone Królestwo.
- (3) SETAC (1993). Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments. Materiały z warsztatów WOSTA zorganizowanych w Niemczech.
- (4) ASTM International/E1706-00 (2002). Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. 1125–1241. W: ASTM International 2002 Annual Book of Standards. Tom 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.
- (5) Environment Canada (1997). Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*). Biological Test Method. Sprawozdanie SPE 1/RM/32. Grudzień 1997.
- (6) US-EPA (2000). Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. Wyd. drugie. EPA 600/R-99/064. Marzec 2000. Zmiana wydania pierwszego z czerwca 1994 r.
- (7) US-EPA/OPPTS 850.1735. (1996): Whole Sediment Acute Toxicity Invertebrates.
- (8) US-EPA/OPPTS 850.1790. (1996): Chironomid Sediment toxicity Test.
- (9) Milani D, Day KE, McLeay DJ, Kirby RS (1996). Recent intra- and inter-laboratory studies related to the development and standardisation of Environment Canada's biological test methods for measuring sediment toxicity using freshwater amphipods (*Hyalella azteca*) and midge larvae (*Chironomus riparius*). Technical Report. Environment Canada. National Water Research Institute. Burlington, Ontario, Kanada.
- (10) Sugaya Y (1997). Intra-specific variations of the susceptibility of insecticides in *Chironomus yoshimatsui*. Jp. J. Sanit. Zool. 48 (4): 345–350.
- (11) Kawai K (1986). Fundamental studies on Chironomid allergy. I. Culture methods of some Japanese Chironomids (Chironomidae, Diptera). Jp. J. Sanit. Zool. 37(1): 47–57.
- (12) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment nr 23.
- (13) Environment Canada (1995). Guidance Document on Measurement of Toxicity Test Precision Using Control Sediments Spiked with a Reference Toxicant. Sprawozdanie EPS 1/RM/30. Wrzesień 1995 r.
- (14) Rozdział C.8 niniejszego załącznika. Toksyczność dla dżdżownic.
- (15) Suedel BC and Rodgers JH (1994). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. Environ. Toxicol. Chem. 13: 1163–1175.
- (16) Naylor C and Rodrigues C (1995). Development of a test method for *Chironomus riparius* using a formulated sediment. Chemosphere 31: 3291–3303.
- (17) Dunnett CW (1964). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statist. Assoc. 50: 1096–1121.

-
- (18) Dunnett CW (1964). New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics* 20: 482–491.
- (19) Williams DA (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. *Biometrics* 27: 103–117.
- (20) Williams DA (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. *Biometrics* 28: 510–531.
- (21) Rao JNK and Scott AJ (1992). A simple method for the analysis of clustered binary data. *Biometrics* 48: 577–585.
- (22) Christensen ER (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. *Water Research* 18: 213–221.
- (23) Bruce and Versteeg (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. *Environmental Toxicology and Chemistry* 11: 1485–1494.
- (24) Slob W (2002). Dose-response modelling of continuous endpoints. *Toxicol. Sci.* 66: 298–312.
-

Dodatek 1

DEFINICJE

Dla celów niniejszej metody badawczej stosowane są następujące definicje:

Osad preparowany lub regenerowany, sztuczny lub syntetyczny stanowi mieszaninę materiałów używaną do naśladowania składników fizycznych naturalnego osadu.

Warstwa wody powyżej osadu to woda, którą zalano osad w naczyniu do badania.

Woda porowa to woda wypełniająca przestrzeń między cząstkami osadu i gleby.

Woda wzbogacona to woda do badania, do której dodano substancję badaną.

Badana substancja chemiczna: każda substancja lub mieszanina badana za pomocą niniejszej metody badawczej.

Dodatek 2

Zalecenia dotyczące hodowli *Chironomus riparius*

1. Larwy ochotki (*Chironomus*) można hodować w naczyniach krystalizacyjnych lub większych zbiornikach. Na dnie zbiornika rozprowadza się drobny piasek kwarcowy, tworząc cienką warstwę grubości od 5 do 10 mm. Odpowiednim substratem okazała się także ziemia okrzemkowa (np. Merck, Art 8117), w przypadku której wystarczająca jest cieńsza warstwa grubości najwyżej kilku milimetrów. Następnie dodaje się odpowiednią wodę na głębokość kilku centymetrów. Poziomy wody należy uzupełniać, aby wyrównać stratę spowodowaną parowaniem i zapobiec wysychaniu. Wodę w razie konieczności można zastępować. Należy zapewnić delikatne napowietrzanie. Naczynia do chowu larw należy przechowywać w odpowiedniej klatce, aby zapobiec ucieczce wylęgniętych osobników dorosłych. Klatka powinna być na tyle duża, by umożliwić rojenie wylęgniętych osobników dorosłych, inaczej może nie dojść do kopulacji (co najmniej ok. 30 × 30 × 30 cm).
2. Klatki powinny być trzymane w temperaturze pokojowej lub w pomieszczeniu o stałych warunkach środowiska w temperaturze 20 ± 2 °C z fotoperiodem wynoszącym 16 godzin światła (o natężeniu ok. 1 000 luksów) i 8 godzin ciemności. Odnotowywano, że wilgotność powietrza mniejsza niż 60 % RH może przeszkodzić rozmnażaniu.

Woda do rozcieńczenia

3. Można stosować każdy rodzaj wody naturalnej lub syntetycznej. Powszechnie stosowana jest woda gruntowa, odchlorowana woda wodociągowa i sztuczne pożywki (np. pożywka Elennda »M4« lub »M7«, zob. także poniżej). Woda przed użyciem powinna być napowietrzona. W miarę potrzeby woda do hodowli może być odnawiana przez ostrożne odlewanie lub wylukowanie zużytej wody z naczyń hodowlanych bez niszczenia oprzędów larw.

Karmienie larw

4. Larwy *Chironomus* należy karmić pokarmem w płatkach dla ryb (Tetra Min®, Tetra Phyll® lub innej marki pokarmem dla ryb) w ilości ok. 250 mg na każde naczynie na dzień. Można go podawać w postaci suchego mielonego proszku lub jako zawiesinę w wodzie: 1 g pokarmu w płatkach dodaje się do 20 ml wody do rozcieńczenia i rozdrabnia się do uzyskania jednorodnej mieszanki. Preparat ten można stosować jako pokarm w ilości ok. 5 ml na każde naczynie na dzień (przed użyciem wstrząsnąć). Starsze larwy mogą dostawać go więcej.
5. Żywienie dostosowuje się do jakości wody. Jeśli pożywka do hodowli staje się mętna, należy ograniczyć karmienie. Podawanie pokarmu należy starannie monitorować. Zbyt mała ilość pożywienia spowoduje migrację larw w kierunku słupa wody, a zbyt duża wywoła zwiększoną aktywność drobnoustrojów i zmniejszone stężenie tlenu. Oba rodzaje warunków mogą spowodować ograniczenie współczynnika wzrostu.
6. Przy przygotowywaniu nowych naczyń do hodowli można też dodać komórki niektórych gatunków zielenic (np. *Scenedesmus subspicatus*, *Chlorella vulgaris*).

Karmienie wylęgniętych osobników dorosłych

7. Niektórzy badacze sugerują, by do karmienia wylęgniętych osobników dorosłych używać tamponu z wełny bawełnianej nasączonego nasyconym roztworem sacharozy.

Wylęg osobników dorosłych

8. Przy temperaturze 20 ± 2 °C po ok. 13–15 dniach w naczyniach do hodowli z larw wylęgłą się osobniki dorosłe. Samce łatwo zidentyfikować dzięki pierzastym czułkom.

Pakiety jaj

9. Po tym, jak osobniki dorosłe pojawią się w klatce hodowlanej, należy trzy razy w tygodniu sprawdzać we wszystkich naczyniach do chowu larw, czy nie zostały złożone galaretowate pakiety jaj. Jeśli tak, należy je ostrożnie usunąć, a następnie przenieść do niewielkiego naczynia zawierającego próbkę wody używanej do hodowli. Pakiety jaj wykorzystuje się do zapoczątkowania hodowli w nowym naczyniu (np. 2–4 pakietów jaj na naczynie) lub do badań toksyczności.
10. Larwy w pierwszym stadium larwalnym powinny wylęgnąć się po 2–3 dniach.

Przygotowanie hodowli w nowych naczyniach

11. Po tym, jak hodowle zostaną założone, powinno być możliwe przygotowanie nowej hodowli larw w świeżym naczyniu raz na tydzień lub rzadziej, w zależności od wymogów badania, przy czym starsze naczynia po wylęgnięciu się w nich dorosłych kuczmanów się usuwa. Stosując ten układ, uzyskuje się stałą podaż dorosłych osobników przy zminimalizowaniu zarzadzania.

Przygotowanie roztworów testowych »M4« i »M7«

12. Pożywka »M4« została opisana przez Elennta (1990). Pożywkę »M7« przygotowuje się jak pożywkę »M4«, z wyjątkiem substancji wskazanych w tabeli 1, których stężenie w »M7« jest czterokrotnie mniejsze niż w »M4«. Publikacja na temat pożywki »M7« znajduje się w przygotowaniu (Elennt, informacje własne). Roztwór testowy nie powinien być przygotowywany zgodnie z instrukcjami Elennta i Biasa (1990), ponieważ stężenia $\text{NaSiO}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$, NaNO_3 , KH_2PO_4 oraz K_2HPO_4 podane dla przygotowania roztworów podstawowych nie są odpowiednie.

Przygotowanie pożywki »M7«

13. Każdy roztwór podstawowy (I) przygotowuje się oddzielnie, a z roztworów podstawowych (I) przygotowuje się łączony roztwór podstawowy (II) (zob. tabela 1). 50 ml łączonego roztworu podstawowego (II) oraz podane w tabeli 2 ilości każdego roztworu podstawowego makroskładnika odżywczego dopełnia się do 1 litra wodą dejonizowaną, aby przygotować pożywkę »M7«. Roztwór podstawowy witamin przygotowuje się przez dodanie trzech witamin do wody dejonizowanej, jak wskazano w tabeli 3. Do końcowej pożywki »M7« na krótko przed użyciem dodaje się 0,1 ml łączonego roztworu podstawowego witamin (roztwór podstawowy witamin przechowuje się zamrożony w małych podwielokrotnościach). Pożywka jest napowietrzana i stabilizowana.

Tabela 1

Roztwory podstawowe pierwiastków śladowych w przypadku pożywek M4 i M7

| Roztwory podstawowe (I) | Ilość (mg) dopełniana do 1 litra wodą dejonizowaną | W celu przygotowania łączonego roztworu podstawowego (II): zmieszać następujące ilości (ml) roztworów podstawowych (I) i dopełnić do 1 litra wodą dejonizowaną | | Końcowe stężenia w w roztworach testowych (mg/l) | |
|---|--|--|------|--|---------|
| | | M4 | M7 | M4 | M7 |
| H_3BO_3 (1) | 57 190 | 1,0 | 0,25 | 2,86 | 0,715 |
| $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ (1) | 7 210 | 1,0 | 0,25 | 0,361 | 0,090 |
| LiCl (1) | 6 120 | 1,0 | 0,25 | 0,306 | 0,077 |
| RbCl (1) | 1 420 | 1,0 | 0,25 | 0,071 | 0,018 |
| $\text{SrCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ (1) | 3 040 | 1,0 | 0,25 | 0,152 | 0,038 |
| NaBr (1) | 320 | 1,0 | 0,25 | 0,016 | 0,004 |
| $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (1) | 1 260 | 1,0 | 0,25 | 0,063 | 0,016 |
| $\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (1) | 335 | 1,0 | 0,25 | 0,017 | 0,004 |
| ZnCl_2 | 260 | 1,0 | 1,0 | 0,013 | 0,013 |
| $\text{CaCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ | 200 | 1,0 | 1,0 | 0,010 | 0,010 |
| KI | 65 | 1,0 | 1,0 | 0,0033 | 0,0033 |
| Na_2SeO_3 | 43,8 | 1,0 | 1,0 | 0,0022 | 0,0022 |
| NH_4VO_3 | 11,5 | 1,0 | 1,0 | 0,00058 | 0,00058 |
| $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (1) (2) | 5 000 | 20,0 | 5,0 | 2,5 | 0,625 |
| $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (1) (2) | 1 991 | 20,0 | 5,0 | 1,0 | 0,249 |

(1) Te substancje różnią się w przypadku M4 i M7, jak określono wyżej.

(2) Roztwory te są przygotowywane oddzielnie, następnie zlewane razem i niezwłocznie autoklawowane.

Tabela 2

Roztwory podstawowe makroskładników odżywczych w przypadku pożywek M4 i M7

| | Ilość (mg) dopełniana do 1 litra wodą dejonizowaną | Ilość (ml/l) roztworów podstawowych makroskładników odżywczych w celu przygotowania pożywek M4 i M7 | Końcowe stężenia (mg/l) w roztworach testowych pożywek M4 i M7 |
|--|--|---|--|
| $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ | 293 800 | 1,0 | 293,8 |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ | 246 600 | 0,5 | 123,3 |

| | Ilość (mg) dopelniana do 1 litra wodą dejonizowaną | Ilość (ml/l) roztworów podstawowych makroskładników odżywczych w celu przygotowania pożywek M4 i M7 | Końcowe stężenia (mg/l) w roztworach testowych pożywek M4 i M7 |
|---|--|---|--|
| KCl | 58 000 | 0,1 | 5,8 |
| NaHCO ₃ | 64 800 | 1,0 | 64,8 |
| NaSiO ₃ · 9 H ₂ O | 50 000 | 0,2 | 10,0 |
| NaNO ₃ | 2 740 | 0,1 | 0,274 |
| KH ₂ PO ₄ | 1 430 | 0,1 | 0,143 |
| K ₂ HPO ₄ | 1 840 | 0,1 | 0,184 |

Tabela 3

Roztwór podstawowy witamin w przypadku pożywek M4 i M7

Ilość (ml/l) roztworu podstawowego witamin dodawanego w celu przygotowania pożywek M4 i M7

| | Wszystkie trzy roztwory witamin łączy się, by otrzymać jeden roztwór podstawowy witamin. | Ilość (mg) dopelniana do 1 litra wodą dejonizowaną | Końcowe stężenia (mg/l) w roztworach testowych pożywek M4 i M7 |
|------------------------|--|--|--|
| Hydrochlorek tiaminy | 750 | 0,1 | 0,075 |
| Cyjanokobalamina (B12) | 10 | 0,1 | 0,0010 |
| Biotyna | 7,5 | 0,1 | 0,00075 |

BIBLIOGRAFIA

BBA (1995). Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system. M. Strelke i H. Köpp (red.). Berlin 1995.

Elenđt BP (1990). Selenium Deficiency in Crustacean. *Protoptasma* 154: 25–33.

Elenđt BP i Bias W-R (1990). Trace Nutrient Deficiency in *Daphnia magna* Cultured in Standard Medium for Toxicity Testing. Effects on the Optimization of Culture Conditions on Life History Parameters of *D. magna*. *Water Research* 24 (9): 1157–1167.

Dodatek 3

PRZYGOTOWANIE OSADU PREPAROWANEGO

Skład osadu

Skład osadu preparowanego powinien być następujący:

| Składnik | Właściwości | % suchej masy osadu |
|-------------------|--|---------------------|
| Torf | Torf z rozkładu mchu torfowca (<i>Sphagnum</i>), w miarę możliwości o wartości pH równej 5,5–6,0, bez widocznych pozostałości roślin, drobno zmielony (wielkość cząstek ≤ 1 mm), suszony powietrzem | 4–5 |
| Piasek kwarcowy | Wielkość ziaren: > 50 % cząstek powinna mieścić się w przedziale 50–200 μm . | 75–76 |
| Glinka kaolinowa | Zawartość kaolinitu ≥ 30 % | 20 |
| Węgiel organiczny | Skorygowana przez dodanie torfu i piasku | 2 ($\pm 0,5$) |
| Węglan wapnia | CaCO_3 , sproszkowany, chemicznie czysty | 0,05–0,1 |
| Woda | Przewodność właściwa ≤ 10 $\mu\text{S/cm}$ | 30–50 |

Przygotowanie

Torf suszy się powietrzem i mieli na drobny proszek. Zawiesinę wymaganej ilości proszku torfowego w wodzie dejonizowanej przygotowuje się z użyciem wysokosprawnego urządzenia do homogenizacji. Wartość pH zawiesiny koryguje się z użyciem CaCO_3 do poziomu $5,5 \pm 0,5$. W celu ustabilizowania pH i komponentu mikrobiologicznego zawiesinę kondycjonuje się przez co najmniej dwa dni w temperaturze 20 ± 2 °C, delikatnie ją mieszając. Ponownie mierzy się pH, którego wartość powinna wynosić $6,0 \pm 0,5$. Następnie zawiesinę torfową miesza się z innymi składnikami (piaskiem i gliną kaolinową) oraz wodą dejonizowaną, aby otrzymać jednorodny osad z zawartością wody w przedziale 30–50 procent suchej masy osadu. Wartość pH końcowej mieszaniny ponownie mierzy się i koryguje w miarę potrzeby za pomocą CaCO_3 do poziomu 6,5 do 7,5. Próbkę osadu pobiera się, aby określić suchą masę i zawartość węgla organicznego. Następnie przed ich wykorzystaniem w badaniu toksyczności dla ohotkowatych zaleca się, by osad preparowany kondycjonować przez siedem dni w tych samych warunkach, jakie panować będą następnie podczas badania.

Przechowywanie

Suche składniki do przygotowywania osadu sztucznego mogą być przechowywane w suchym i chłodnym miejscu w temperaturze pokojowej. Nie powinno się przechowywać (mokrego) osadu preparowanego przed jego użyciem w badaniu. Osad należy wykorzystać natychmiast po 7-dniowym okresie kondycjonowania, kończącym proces jego przygotowania.

BIBLIOGRAFIA:

Rozdział C.8 niniejszego załącznika. Toksyczność dla dżdżownic.

Meller M, Egeler P, Rombke J, Schallnass H, Nagel R, Streit B (1998). Short-term Toxicity of Lindane, Hexachlorobenzene and Copper Sulfate on Tubificid Sludgeworms (*Oligochaeta*) in Artificial Media. *Ecotox. and Environ. Safety* 39: 10-20.

Dodatek 4

Właściwości chemiczne dopuszczalnej wody do rozcieńczania

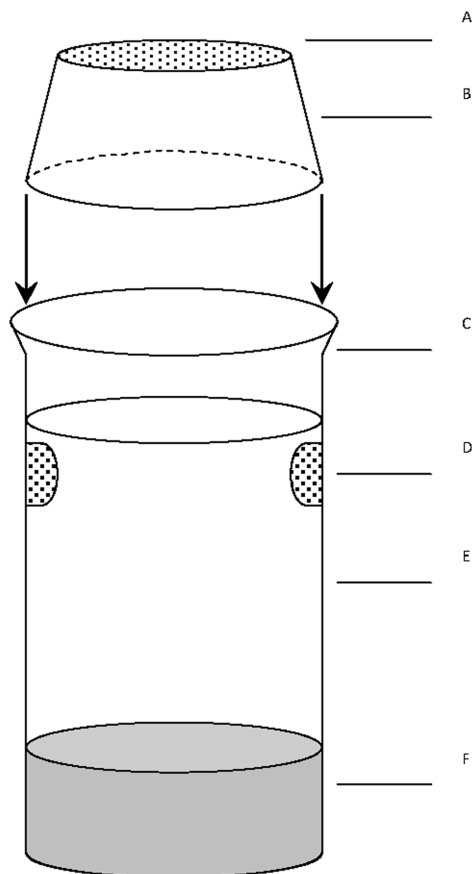
| Substancja | Stężenia |
|--|----------------|
| Cząstki stałe | < 20 mg/l |
| Całkowity węgiel organiczny | < 2 mg/l |
| Niejonizowany amoniak | < 1 µg/l |
| Twardość w przeliczeniu na CaCO ₃ | < 400 mg/l (*) |
| Chlor resztkowy | < 10 µg/l |
| Całkowita zawartość pestycydów fosforoorganicznych | < 50 ng/l |
| Całkowita zawartość pestycydów chloroorganicznych plus polichlorowanych bifenyli | < 50 ng/l |
| Całkowity chlor organiczny | < 25 ng/l |

(*) Należy jednak pamiętać, że jeżeli podejrzewa się interakcję między jonami powodującymi twardość wody a substancją badaną, powinna być stosowana woda o mniejszej twardości (a zatem w takim przypadku nie wolno używać pożywki Elennda M4).

Dodatek 5

Wytyczne dotyczące monitorowania wylęgu larw ochotkowatych

Na szklanych zlewkach do badania umieszczono pułapki na wylęgnięte kuczmany. Pułapki te potrzebne są od 20 dnia badania do zakończenia badania. Poniżej przedstawiono rysunek przedstawiający przykładową pułapkę:



- | | |
|----------------------------------|---------------------------------------|
| A: siatka nylonowa | D: osiatkowane otwory do wymiany wody |
| B: odwrócone kubeczki plastikowe | E: woda |
| C: zlewka bez dzióbka do badania | F: osad |

C.29. SZYBKA BIODEGRADOWALNOŚĆ – CO₂ W SZCZELNIE ZAMKNIĘTYCH NACZYNIACH (Badanie fazy gazowej nad roztworem)

WSTĘP

- Niniejsza metoda badawcza jest równoważna z dotyczącą badań wytyczną OECD nr 310 (2006). Niniejsza metoda badawcza jest metodą przesiewową służącą do oceny szybkiej biodegradowalności chemikaliów, która dostarcza podobnych informacji, jak sześć metod badawczych A–F opisanych w rozdziale C.4 niniejszego załącznika. Zatem substancję chemiczną dającą dodatnie wyniki w niniejszej metodzie badawczej można uznać za ulegającą szybkiej biodegradacji, a co za tym idzie, ulegającą szybkiej degradacji w środowisku.
- Ogólnie przyjętą metodę badania wydzielania się dwutlenku węgla (CO₂) (1), opartą na pierwotnym badaniu Sturma (2) służącym ocenie biodegradowalności organicznych substancji chemicznych w drodze pomiaru ilości dwutlenku węgla wytworzonego w wyniku aktywności mikrobiologicznej, wybierano zazwyczaj w pierwszej kolejności, by zbadać słabo rozpuszczalne chemikalia oraz te, które silnie adsorbują. Wybiera się ją także dla chemikaliów rozpuszczalnych (ale nie lotnych), ponieważ wielu uznaje wydzielanie się dwutlenku węgla za jedyny jednoznaczny dowód aktywności mikrobiologicznej. Usuwanie rozpuszczonego węgla organicznego można uzyskać w drodze procesów fizykochemicznych – adsorpcji, ulatniania się, strącania, hydrolizy – jak również aktywności mikrobiologicznej oraz wielu reakcji niebiologicznych, w których zużywany jest tlen; rzadko CO₂ powstaje z substancji organicznych w sposób abiotyczny. W pierwotnym i zmodyfikowanym

badaniu Sturma (1) (2) CO₂ usuwa się z fazy ciekłej do naczyń absorbujących w drodze napowietrzania (tzn. przepuszczania powietrza poddawanego obróbcie przez pożywkę ciekłą celem usunięcia CO₂), natomiast w wersji Larsona (3) (4) CO₂ przemieszcza się z naczynia reakcyjnego do absorberów dzięki przepuszczaniu powietrza wolnego od CO₂ przez fazę gazową nad roztworem i dodatkowo ciągłemu potrząsaniu naczyniem badawczym. Naczyniem reakcyjnym potrząsa się jedynie w modyfikacji Larsona; mieszanie jest przewidziane jedynie w przypadku substancji nierozpuszczalnych wymienionych w normie ISO 9439 (5) oraz w pierwotnej wersji amerykańskiej (6); w obu tych normach przewidziano napowietrzanie, a nie wymianę fazy gazowej nad roztworem. W innej oficjalnej metodzie amerykańskiej EPA (7), opartej na metodzie Gledhilla (8), potrząsane naczynie reakcyjne jest zamknięte dla atmosfery, a wytworzony CO₂ gromadzi się w wewnętrznej pułapce alkalicznej bezpośrednio z fazy gazowej, tak jak w klasycznych kolbach respirometrów Warburga/Barcrofta.

3. Wykazano jednak, że węgiel nieorganiczny (IC) kumuluje się w pożywce, gdy standardowe, zmodyfikowane badanie Sturma stosuje się do kilku chemikaliów (9). Stwierdzono stężenie węgla nieorganicznego w wysokości nawet 8 mg/l w czasie rozkładu aniliny o zawartości 20 mg C/l. Zatem gromadzenie się CO₂ w pułapkach alkalicznych nie oddawało wiernie ilości CO₂ wyprodukowanego mikrobiologicznie w międzyczasie w trakcie rozkładu. W efekcie specyfikacja, zgodnie z którą, aby badana substancja chemiczna została sklasyfikowana jako ulegająca szybkiej biodegradacji, w ciągu 10-dniowego »okna« (10 dni bezpośrednio po osiągnięciu 10-procentowej biodegradacji) należy zebrać > 60 % teoretycznej maksymalnej ilości wytworzonego CO₂ (ThCO₂), nie zostanie spełniona dla niektórych chemikaliów, które zostałyby tak sklasyfikowane przy użyciu metody usuwania rozpuszczalnego węgla organicznego (DOC).
4. Jeśli wartość procentowego rozkładu jest mniejsza niż oczekiwana, węgiel nieorganiczny być może nagromadził się w badanym roztworze. Wówczas degradowalność można ocenić za pomocą innych badań na szybkość biodegradowalność.
5. Inne wady metodologii Sturma (która jest uciążliwa, czasochłonna, bardziej podatna na błędy doświadczalne i nie daje się zastosować do chemikaliów lotnych) już wcześniej spowodowały poszukiwania techniki z zastosowaniem szczególnie zamkniętych naczyń, innej niż metoda Gledhilla, zamiast metody przepływowo-gazowej (10) (11). Boatman i in. (12) dokonali przeglądu wcześniejszych metod i przyjęli system zamkniętej przestrzeni nad roztworem, w której CO₂ uwalniano do fazy gazowej nad roztworem pod koniec inkubacji poprzez zakwaszenie pożywki. CO₂ mierzono metodą chromatografii gazowej (GC)/analizy węgla nieorganicznego (IC) w automatycznie pobieranych próbkach fazy gazowej nad roztworem, jednak nie uwzględniono rozpuszczonego węgla nieorganicznego (DIC) w fazie ciekłej. Ponadto zastosowane naczynia były bardzo małe (20 ml) i zawierały jedynie 10 ml pożywki, co powodowało problemy np. przy dodawaniu z konieczności bardzo małych ilości nierozpuszczalnych badanych substancji chemicznych, a w zaszczipionej pożywce może być niewystarczająca ilość mikroorganizmów zdolnych do rozłożenia badanych substancji chemicznych lub też może ich nie być wcale.
6. Trudności te w niezależnych badaniach przezwyciężyli Struijs i Stoltenkamp (13) oraz Birch i Fletcher (14); drugie z tych badań było inspirowane doświadczeniem badacza z aparaturą stosowaną w badaniu biodegradacji beztlenowej (15). W poprzedniej metodzie (13) CO₂ mierzy się w przestrzeni nad roztworem po zakwaszeniu i ustaleniu stanu równowagi, natomiast w drugiej (14) mierzono DIC zarówno w fazie gazowej, jak i w fazie ciekłej, bez dodawania substancji; ponad 90 % wytworzonego IC znajdowało się w fazie ciekłej. Obie metody posiadały zalety w porównaniu z badaniem Sturma: system badawczy był bardziej zwarty i łatwiejszy w obsłudze, umożliwia on badanie lotnych chemikaliów i możliwe jest uniknięcie opóźnienia w pomiarze wytworzonego CO₂.
7. Te dwa podejścia połączono w normie ISO dotyczącej oznaczania gazowego CO₂ nad roztworem (16), którą poddano badaniu międzylaboratoryjnemu (17) i to ta norma stanowi podstawę dla niniejszej metody badawczej. Podobnie te dwa podejścia zastosowano w metodzie amerykańskiej EPA (18). Zalecono dwie metody pomiaru CO₂, mianowicie CO₂ w fazie gazowej nad roztworem po zakwaszeniu (13) oraz IC w fazie ciekłej po dodaniu nadmiaru zasady. Drugą metodę wprowadził Peterson w czasie badania międzylaboratoryjnego CONCAWE (19) niniejszej metody pomiaru CO₂ w fazie gazowej nad roztworem, zmodyfikowanej dla celów pomiaru naturalnej podatności na biodegradację. W niniejszą metodę badawczą włączono zmiany wprowadzone w 1992 r. (20) w ramach rewizji metod opisanych w rozdziale C.4 niniejszego załącznika w odniesieniu do szybkiej biodegradowalności, tak że warunki (pożywka, czas trwania itp.) są poza tym takie same, jak zastosowane w poprawionym badaniu Sturma (20). Birch i Fletcher (14) wykazali, że przy pomocy niniejszej metody pomiaru CO₂ w fazie gazowej nad roztworem otrzymano bardzo podobne wyniki, jak w przypadku tych samych chemikaliów w badaniu międzylaboratoryjnym OECD (21) w odniesieniu do poprawionych metod badawczych.

ZASADA BADANIA

8. Badaną substancję chemiczną zawierającą zwykle 20 mg C/l, jako jedyne źródło węgla i energii inkubuje się w buforowej pożywce mineralnej, którą zaszczipiono mieszaną populacją mikroorganizmów. Badanie przeprowadza się w szczelnie zamkniętych butlach z powietrzem w fazie gazowej nad roztworem, co zapewnia zbiornik tlenu na potrzeby biodegradacji tlenowej. Wydzielanie się CO₂ wynikające z całkowitej biodegradacji tlenowej badanej substancji chemicznej określa się w drodze pomiaru ilości IC wytworzonego w badanych butlach przekraczającej ilość wytworzoną w naczyniach ślepej próby zawierających jedynie zaszczipioną pożywkę. Stopień biodegradacji wyraża się jako odsetek teoretycznej maksymalnej ilości wytworzonego IC (ThIC), w odniesieniu do ilości badanej substancji chemicznej (jak np. węgiel organiczny) dodanej na początku.
9. Możliwy jest również pomiar usuwania DOC lub stopnia pierwotnej biodegradacji badanej substancji chemicznej (20).

INFORMACJE NA TEMAT BADANEJ SUBSTANCJI CHEMICZNEJ

10. Zawartość węgla organicznego (% w/w) badanej substancji chemicznej musi być znana z jej struktury chemicznej lub w wyniku pomiaru, tak by możliwe było obliczenie procentowego rozkładu. W przypadku lotnych badanych substancji chemicznych do określenia odpowiedniego stosunku objętości fazy gazowej nad roztworem do objętości cieczy pomocna jest zmierzona lub obliczona stała Henry'ego. Informacje na temat toksyczności badanej substancji chemicznej dla mikroorganizmów są przydatne przy wyborze odpowiedniego stężenia stosowanego w badaniu oraz przy interpretacji wyników wskazujących na słabą biodegradowalność: zaleca się uwzględnienie kontroli hamowania, chyba że wiadomo, że badana substancja chemiczna nie hamuje aktywności mikrobiologicznej (zob. pkt 24).

ZAKRES STOSOWANIA METODY

11. Badanie ma zastosowanie do badanych substancji chemicznych rozpuszczalnych i nierozpuszczalnych w wodzie, chociaż należy zapewnić dobrą dyspersję badanej substancji chemicznej. Stosując zalecany stosunek objętości fazy gazowej nad roztworem do objętości cieczy 1:2, można badać lotne chemikalia o stałej Henry'ego wynoszącej do $50 \text{ Pa}\cdot\text{m}^3\cdot\text{mol}^{-1}$, gdyż proporcja badanej substancji chemicznej w przestrzeni nad roztworem nie przekroczy 1 % (13). Mniejszą objętość fazy gazowej nad roztworem można zastosować przy badaniu chemikaliów, które są bardziej lotne, ale ich biodostępność może być ograniczona, zwłaszcza jeśli są słabo rozpuszczalne w wodzie. Użytkownicy muszą jednak dopilnować, aby stosunek objętości fazy gazowej nad roztworem do objętości cieczy oraz stężenie badanej substancji chemicznej były takie, że dostępna będzie wystarczająca ilość tlenu, by możliwa była całkowita biodegradacja tlenowa (np. należy unikać wysokiego stężenia substratu i niewielkiej objętości przestrzeni nad roztworem). Wytyczne w tej kwestii można znaleźć w (13) (23).

SUBSTANCJE ODNIESIENIA

12. Celem sprawdzenia procedury badania należy równolegle badać substancję odniesienia o znanej biodegradowalności. W tym celu można zastosować anilinę, benzoesan sodu lub glikol etylenowy przy badaniu rozpuszczalnych w wodzie badanych substancji chemicznych oraz 1-oktanol dla słabo rozpuszczalnych badanych substancji chemicznych (13). Biodegradacja tych chemikaliów musi wynieść > 60 % ThIC w ciągu 14 dni.

ODTWARZALNOŚĆ

13. W przewidzianym normą ISO badaniu międzylaboratoryjnym metody (17) uzyskano następujące rezultaty przy zastosowaniu zalecanych warunków, w tym badanej substancji chemicznej zawierającej 20 mg C/l.

| Badana substancja chemiczna | Średnia biodegradacja procentowa (28d) | Współczynnik zmienności (%) | Liczba laboratoriów |
|-----------------------------|--|-----------------------------|---------------------|
| Anilina | 90 | 16 | 17 |
| 1-Oktanol | 85 | 12 | 14 |

Zmienność wewnętrzna badania (odtworzalność) przy zastosowaniu aniliny była niska, a współczynniki zmienności nie przekraczały 5 % w prawie wszystkich rundach badania. W dwóch przypadkach, w których odtwarzalność była gorsza, większa zmienność wynikała prawdopodobnie z dużej produkcji IC w ślepych próbach. Odtwarzalność była gorsza dla 1-oktanolu, jednak nadal wynosiła mniej niż 10 % dla 79 % rund badania. Ta większa zmienność wewnętrzna badania mogła wynikać z błędów w dozowaniu, gdyż trzeba było wstrzyknąć niewielką objętość (3 do 4 μl) 1-oktanolu do szczelnie zamkniętych badanych butli. Wyższe współczynniki zmienności otrzymano by przy zastosowaniu niższych stężeń badanych substancji chemicznych, zwłaszcza stężeń mniejszych niż 10 mg C/l. Można to częściowo przewyciężyć, redukując stężenie całkowitego węgla nieorganicznego (TIC) w inokulum.

14. W przeprowadzonym w UE badaniu międzylaboratoryjnym (24) pięciu środków powierzchniowo czynnych zawierających 10 mg C/l otrzymano następujące wyniki:

| Badana substancja chemiczna | Średnia biodegradacja procentowa (28d) | Współczynnik zmienności (%) | Liczba laboratoriów |
|---|--|-----------------------------|---------------------|
| Sulfonian tetrapropylenobenzenu | 17 | 45 | 10 |
| Sulfobursztynian diizooktylu (anionowy) | 72 | 22 | 9 |
| Chlorek heksadecylotrimetylamoniowy (*) (kationowy) | 75 | 13 | 10 |

| Badana substancja chemiczna | Średnia biodegradacja procentowa (28d) | Współczynnik zmienności (%) | Liczba laboratoriów |
|---|--|-----------------------------|---------------------|
| Oksyetylenowany izononylofenol ₉ (niejonowy) | 41 | 32 | 10 |
| Kokamidopropyl Dimetylohydroksy Sulfobetaina (amfoteryczna) | 60 | 23 | 11 |

(*) Dodano SiO₂ celem neutralizacji toksyczności.

Wyniki pokazują, że na ogół zmienność była wyższa dla środków powierzchniowo czynnych słabiej ulegających rozkładowi. Zmienność wewnętrzna badania wynosiła mniej niż 15 % w ponad 90 % przypadków, przy czym najwyższa dochodziła do 30-40 %.

Uwaga: Większość środków powierzchniowo czynnych nie stanowi pojedynczych odmian cząsteczkowych, ale raczej mieszaniny izomerów, homologów itp., które ulegają rozkładowi po różnym charakterystycznym okresie opóźnienia i z inną szybkością, co skutkuje »niejasnymi«, osłabionymi krzywymi, tak że wartość progowa 60 % może nie zostać osiągnięta w 10-dniowym »oknie«, nawet jeśli każda z poszczególnych odmian cząsteczkowych poddana badaniu osobno osiągnęłaby wartość > 60 % w ciągu 10 dni. Można to zaobserwować także w przypadku innych złożonych mieszanin.

OPIS METODY

Urządzenia

15. Zwykłe urządzenia laboratoryjne oraz:

- a) szklane butelki na osocze, szczelnie zamknięte korkami z kauczuku butylowego i zaciskanyymi uszczelkami aluminiowymi. Zalecany rozmiar to »125 ml« o łącznej objętości ok. 160 ml (w tym przypadku objętość każdej butelki powinna być znana jako 160 ± 1 ml). Można użyć mniejszego naczynia, jeżeli wyniki spełniają warunki opisane w pkt 66 i 67;
- b) analizator węgla lub inny przyrząd (np. chromatograf gazowy) do pomiarów węgla nieorganicznego;
- c) strzykawkę o dużej precyzji do pobierania próbek gazowych i ciekłych;
- d) wyrząsarka orbitalna w środowisku o kontrolowanej temperaturze;
- e) Zaopatrzenie w powietrze wolne od CO₂ – można je przygotować przeprowadzając powietrze przez granule wapna sodowanego lub stosując mieszaninę gazową 80 % N₂/20 % O₂ (fakultatywnie) (zob. pkt 28);
- f) membranowe urządzenie filtracyjne o porowatości 0,20–0,45 µm (fakultatywnie);
- g) analizator węgla organicznego (fakultatywnie).

Odczynniki

16. W całym badaniu należy stosować odczynniki do analiz.

Woda

17. Należy stosować wodę destylowaną lub dejonizowaną, zawierającą ≤1 mg/l całkowitego węgla organicznego. Odpowiada to ≤ 5 % początkowej zawartości węgla organicznego wprowadzonej zalecaną dawką badanej substancji chemicznej.

Roztwory podstawowe na pożywkę mineralną

18. Roztwory podstawowe oraz pożywki mineralne są podobne do stosowanych w normie ISO 14593 (16) oraz w badaniach C.4 na »szybką biodegradowalność« (20). Zastosowanie większego stężenia chlorku amonu (2,0 g/l zamiast 0,5 g/l) powinno być konieczne jedynie w bardzo wyjątkowych przypadkach, np. kiedy stężenie badanej substancji chemicznej wynosi > 40 mg C/l. Roztwory podstawowe należy przechowywać w warunkach chłodniczych i usuwać po sześciu miesiącach lub wcześniej, jeśli wystąpią objawy strącania lub rozwoju mikroorganizmów. Należy przygotować następujące roztwory podstawowe:

- a) diwodorofosforan potasu (KH_2PO_4) 8,50 g
- wodorofosforan potasu, (K_2HPO_4) 21,75 g
- wodorofosforan sodu dwuwodny ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 33,40 g
- chlerek amonu (NH_4Cl) 0,50 g

Rozpuścić w wodzie i dopełnić do 1 litra. Wartość pH tego roztworu powinna wynosić 7,4 ($\pm 0,2$). Jeśli jest inaczej, należy przygotować nowy roztwór;

- b) chlerek wapnia dwuwodny ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 36,40 g

Rozpuścić w wodzie i dopełnić do 1 litra;

- c) siarczan magnezu siedmiowodny ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 22,50 g

Rozpuścić w wodzie i dopełnić do 1 litra;

- d) chlerek żelaza(III) sześciowodny ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 0,25 g

Rozpuścić w wodzie i dopełnić do 1 litra oraz dodać jedną kroplę stężonego HCl.

Przygotowanie pożywki mineralnej

19. Zmieszać 10 ml roztworu a) z ok. 800 ml wody (pkt 17), następnie dodać 1 ml roztworów b), c) i d) i dopełnić wodą do 1 litra (pkt 17).

Inne odczynniki

20. Stężony kwas ortofosforowy (H_3PO_4) (> 85 % w/v).

Roztwór 7M wodorotlenku sodu

21. Rozpuścić 280 g wodorotlenku sodu (NaOH) w 1 litrze wody (pkt 17). Określić stężenie DIC w tym roztworze i uwzględnić tę wartość przy obliczaniu wyników badania (zob. pkt 55 i 61), zwłaszcza w świetle kryterium ważności określonego w pkt 66 b). Przygotować nowy roztwór, jeśli stężenie DIC jest zbyt wysokie.

Badana substancja chemiczna

22. Przygotować roztwór podstawowy wystarczająco rozpuszczalnej w wodzie badanej substancji chemicznej w wodzie (pkt 17) lub w pożywce (pkt 19), najlepiej w stężeniu 100-krotnie większym niż ostateczne stężenie, które ma być zastosowane w badaniu; może być konieczne dostosowanie pH roztworu podstawowego. Roztwór podstawowy należy dodać do pożywki mineralnej, by uzyskać ostateczne stężenie węgla organicznego między 2 a 40 mg C/l, najlepiej 20 mg C/l. Jeśli stosuje się stężenia mniejsze niż wymienione, uzyskana precyzja może ulec pogorszeniu. Rozpuszczalne i nierozpuszczalne chemikalia ciekłe można dodać bezpośrednio do naczyń za pomocą wysoce precyzyjnych strzykawek. Słabo rozpuszczalne i nierozpuszczalne badane substancje chemiczne mogą wymagać specjalnego podejścia (25). Do wyboru jest:

- a) bezpośrednie dodanie znanych, zważonych ilości;
- b) rozpraszanie ultradźwiękowe przed dodaniem;
- c) dyspersja za pomocą środków emulgujących; wymagane jest określenie przed dodaniem, czy działają one hamująco, czy stymulująco na aktywność mikrobiologiczną;
- d) adsorpcja ciekłych badanych substancji chemicznych lub rozpuszczenie w odpowiednim lotnym rozpuszczalniku, na obojętną pożywkę lub podłoże (np. filtr z włókna szklanego), następnie odparowanie rozpuszczalnika, jeśli został użyty, i bezpośrednie dodanie znanych ilości;
- e) dodanie do pustego naczynia badawczego znanej objętości roztworu badanej substancji chemicznej w rozpuszczalniku łatwo przechodzącym w fazę lotną, a następnie odparowanie rozpuszczalnika.

Środki lub rozpuszczalniki użyte w lit. c), d) i e) należy zbadać pod kątem ewentualnego działania stymulującego lub hamującego dla aktywności mikrobiologicznej (zob. pkt 42b)).

Substancja odniesienia

23. Przygotować roztwór podstawowy (rozpuszczalnej) substancji odniesienia w wodzie (pkt 17), najlepiej w stężeniu 100-krotnie większym niż ostateczne stężenie, które ma być zastosowane (20 mg C/l) w badaniu.

Kontrola działania hamującego

24. Badane substancje chemiczne często nie wykazują istotnego rozkładu w warunkach stosowanych przy ocenianiu szybkiej biodegradowalności. Jedyną możliwą przyczyną jest to, że badana substancja chemiczna działa hamująco na inokulum w stężeniu, w którym jest stosowana w badaniu. Kontrolę działania hamującego można uwzględnić w projekcie badania celem ułatwienia identyfikacji (z perspektywy czasu) działania hamującego jako możliwej przyczyny lub czynnika przyczyniającego się do tego stanu rzeczy. Ewentualnie kontrola działania hamującego może wykluczyć takie interferencje i wykazać, że zerowy lub niewielki rozkład można przypisać jedynie brakowi podatności na działanie mikroorganizmów w warunkach, w których przeprowadza się badanie. Aby uzyskać informacje co do toksyczności badanej substancji chemicznej dla mikroorganizmów (tlenowych), należy przygotować roztwór w pożywce zawierający badaną substancję chemiczną i substancję odniesienia (pkt 19), każdą odpowiednio w tym samym stężeniu, w jakim jest dodawana (zob. ust 22 i 23).

Inokulum

25. Inokulum można uzyskać z różnych źródeł: osad czynny; odpływ z oczyszczalni ścieków (niechlorowany); wody powierzchniowe i gleby; lub z mieszaniny tychże (20). Należy sprawdzić aktywność biodegradacyjną źródła poprzez zastosowanie substancji odniesienia. Niezależnie od źródła nie należy stosować mikroorganizmów wcześniej narażonych na badaną substancję chemiczną, jeśli procedura ma być stosowana do badania szybkiej biodegradowalności.

Ostrzeżenie: Osad czynny, ścieki i odpływ z oczyszczalni ścieków zawierają czynniki chorobotwórcze i należy obchodzić się z nimi ostrożnie.

26. Z doświadczenia wynika, że optymalna objętość inokulum to taka, która:

- jest wystarczająca, by dać odpowiednią aktywność biodegradacyjną,
- rozkłada substancję odniesienia w określonym procentowo stopniu (zob. pkt 66),
- daje od 10^2 do 10^5 jednostek tworzących kolonię na mililitr w mieszaninie końcowej,
- zazwyczaj daje stężenie 4 mg/l zawiesiny ciał stałych w mieszaninie końcowej w przypadku zastosowania osadu czynnego; możliwe jest użycie stężeń do 30 mg/l, jednak mogą one znacznie zwiększyć produkcję CO_2 naczyniach ślepej próby (26),
- wnosi mniej niż 10 % pierwotnego stężenia węgla organicznego, wprowadzanego przez badaną substancję chemiczną,
- wynosi na ogół 1-10 ml inokulum na 1 litr badanego roztworu.

Osad czynny

27. Świeżą próbkę osadu czynnego zbiera się z komory napowietrzania oczyszczalni ścieków lub urządzenia w skali laboratoryjnej, przerabiającego głównie ścieki domowe. W razie konieczności cząstki gruboziarniste należy usunąć w drodze odsiewania (np. stosując sito oczkowe o rozmiarze oczek 1 mm^2), a osad należy utrzymywać w warunkach tlenowych aż do chwili użycia.
28. Ewentualnie zsedymtować lub odwirować (np. przy $1\ 100 \times \text{g}$ przez 10 minut) po usunięciu wszystkich cząstek gruboziarnistych. Odrzucić supernatant. Można przemyć osad w roztworze mineralnym. Zawiesić stężony osad w pożywce mineralnej dla uzyskania stężenia 3-5 g zawiesiny ciał stałych/l. Następnie napowietrzać do wymaganego momentu.
29. Osad należy pobrać z prawidłowo działającej konwencjonalnej oczyszczalni ścieków. Jeżeli osad trzeba pobrać z oczyszczalni o wysokiej szybkości oczyszczania lub podejrzewa się zawartość inhibitorów, należy go przemyć. Zsedymtować lub odwirować ponownie zawieszony osad po energicznym wymieszaniu, odrzucić supernatant i ponownie zawiesić przemyty osad w dalszej objętości pożywki mineralnej. Powtarzać tę procedurę do czasu, gdy uzna się, iż osad jest wolny od nadmiaru substratów lub inhibitorów.
30. Po osiągnięciu ponownego zawieszenia lub w przypadku osadu niepoddanego obróbce odstawić próbkę tuż przed jej użyciem celem ustalenia suchej masy ciał stałych w zawieszynie.

31. Inną możliwością jest homogenizacja osadu czynnego (3–5 g zawiesiny ciał stałych/l). Rozdrobnić osad w homogenizatorze Waringa przy średniej szybkości przez 2 minuty. Zsedymetować rozdrobniony osad przez 30 minut lub dłużej, w razie potrzeby, i zdekantować ciecz do użycia jako inokulum w ilości ok. 10 ml/l pożywki mineralnej.
32. Jeszcze większą redukcję wydzielania CO₂ w ślepej próbie można osiągnąć napowietrzając osad w nocy powietrzem wolnym od CO₂. Jako stężenia inokulum w tym badaniu należy zastosować 4 mg/l ciał stałych z osadu czynnego (13).

Ścieki oczyszczone

33. Ewentualnie inokulum można uzyskać ze ścieków oczyszczonych z oczyszczalni ścieków lub urządzenia w skali laboratoryjnej przyjmującego głównie ścieki domowe. Należy utrzymywać próbkę w warunkach tlenowych i użyć w dniu pobrania lub w razie potrzeby wstępnie kondycjonować. Ścieki należy przefiltrować przez filtr gruboziarnisty celem usunięcia grubych cząstek stałych, a także zmierzyć wartość pH.
34. Celem zmniejszenia zawartości IC filtrat napowietrza się powietrzem wolnym od CO₂ (pkt 15-e) przez 1 godzinę, utrzymując pH na poziomie 6,5 za pomocą kwasu ortofosforowego (pkt 20). Wartość pH przywraca się do pierwotnego poziomu za pomocą wodorotlenku sodu (pkt 21), a po sedimentacji przez ok. 1 godzinę odpowiednią objętość supernatantu pobiera się do inokulacji. Wspomniana procedura napowietrzania zmniejsza zawartość IC w inokulum. Np. gdy jako inokulum zastosowano maksymalną zalecaną objętość przefiltrowanych, napowietrzonych ścieków (100 ml) na litr, ilość IC obecnego w naczyniach kontrolnej ślepej próby kształtowała się w zakresie między 0,4 a 1,3 mg/l (14), co odpowiada 2–6,5 % C w badanej substancji chemicznej przy zawartości 20 mg C/l i 4–13 % przy zawartości 10 mg C/l.

Wody powierzchniowe

35. Pobiera się próbkę odpowiedniej wody powierzchniowej. Należy ją utrzymywać w warunkach tlenowych i użyć w dniu pobrania. Jeżeli to konieczne, należy zateńczyć próbkę poprzez filtrację lub odwirowanie. Objętość inokulum do zastosowania w każdym z naczyń badawczych powinna spełniać kryteria podane w pkt 26.

Gleby

36. Pobiera się próbkę odpowiedniej gleby z głębokości do 20 cm poniżej powierzchni gleby. Kamienie, resztki roślin i bezkręgowce należy usunąć z próbki gleby przed przesianiem jej przez sito o oczkach 2 mm (jeśli próbka jest zbyt wilgotna, by można ją było przesiać natychmiast, wówczas należy częściowo wysuszyć ją powietrzem, aby ułatwić przesiewanie). Należy ją utrzymywać w warunkach tlenowych i użyć w dniu pobrania. (Jeśli próbka jest transportowana w luźno zawiązanej torbie polietylenowej, można ją przechowywać w torbie w temperaturze od 2 do 4 °C przez okres do jednego miesiąca).

Wstępne przygotowanie inokulum

37. Inokulum może być wstępnie kondycjonowane do warunków eksperymentalnych, lecz nie wstępnie adaptowane do badanej substancji chemicznej. Wstępne kondycjonowanie może zmniejszyć wydzielanie CO₂ w ślepej próbie. Wstępne kondycjonowanie obejmuje napowietrzanie osadu czynnego po rozpuszczeniu w pożywce do 30 mg/l wilgotnym powietrzem wolnym od CO₂ przez maksymalnie 5-7 dni w temperaturze badania.

PROCEDURA BADANIA

Liczba butli

38. Liczba butli (pkt 15-a) potrzebnych do badania będzie zależna od częstotliwości analizy i czasu trwania badania.
39. Zaleca się poddawanie analizie trzech butli w wystarczającej liczbie odstępów czasowych, tak aby można było zidentyfikować 10-dniowe okno. Na koniec badania analizuje się co najmniej pięć badanych butli (pkt 15-a) z zestawów a), b) i c) (zob. pkt 42), aby umożliwić obliczenie przedziałów ufności wynoszących 95 % w odniesieniu do średniej wartości procentowej biodegradacji.

Zaszczepiona pożywka

40. Inokulum stosuje się w stężeniu 4 mg/l cząstek stałych osadu czynnego. Bezpośrednio przed użyciem należy przygotować wystarczającą ilość zaszczepionej pożywki poprzez dodanie na przykład 2 ml odpowiednio spreparowanego osadu czynnego (pkt 27-32) w dawce 2 000 mg/l do 1 litra pożywki mineralnej (pkt 19). W przypadku wykorzystania ścieków oczyszczonych należy dodać maksymalnie 100 ml odpływu (pkt 33) do 900 ml pożywki mineralnej (pkt 19) i rozcieńczyć pożywką do objętości 1 litra.

Przygotowanie butli

41. Podwielokrotności zaszczepionej pożywki rozdziela się do replikowanych butli, aby zapewnić stosunek objętości fazy gazowej nad roztworem do objętości cieczy wynoszący 1:2 (np. dodać 107 ml do butli o pojemności 160 ml). Można zastosować inne proporcje – zob. ostrzeżenie w pkt 11. Podczas korzystania z każdego rodzaju inokulum należy dopilnować, aby zaszczepiona pożywka była w wystarczającym stopniu wymieszana, co ma na celu zapewnienie równego rozdzielenia cieczy między butle do badania.
42. Przygotowuje się zestawy butli (pkt 15a) zawierające następujące elementy:
 - a) naczynia do badania (oznaczone jako F_T) zawierające badaną substancję chemiczną;
 - b) próby ślepe (oznaczone jako F_B) zawierające wyłącznie pożywkę do badania wraz z inokulum; należy również dodać wszelkie substancje chemiczne, rozpuszczalniki, środki lub filtry z włókna szklanego użyte do wprowadzenia badanej substancji chemicznej do naczynia do badania;
 - c) naczynia (oznaczone jako F_C) zawierające substancję odniesienia na potrzeby sprawdzenia procedury;
 - d) w razie potrzeby naczynia (oznaczone jako F_I) służące do sprawdzenia możliwych skutków hamujących badanej substancji chemicznej, zawierające zarówno badaną substancję chemiczną, jak i substancję odniesienia w takim samym stężeniu (pkt 24) jak odpowiednio w butlach F_T i F_C ;
 - e) naczynia (oznaczone jako F_S) służące do sprawdzenia możliwego abiotycznego rozkładu jak a) plus 50 mg/l $HgCl_2$ lub wysterylizowane w inny sposób (np. poprzez autoklawowanie).
43. Rozpuszczalne w wodzie badane substancje chemiczne i substancje odniesienia dodaje się jako wodne roztwory podstawowe (pkt 22, 23 i 24), aby uzyskać stężenie wynoszące 10–20 mg C/l.
44. nierozpuszczalne badane substancje chemiczne i nierozpuszczalne substancje odniesienia dodaje się do butli w różny sposób (zob. pkt 22a–e), w zależności od charakteru badanej substancji chemicznej, albo przed dodaniem zaszczepionej pożywki, albo później – zależnie od metody postępowania z badaną substancją chemiczną. W przypadku korzystania z jednej z procedur określonych w pkt 22a–e, butle na potrzeby ślepej próby F_B (pkt 42b) należy potraktować w podobny sposób, lecz z pominięciem badanej substancji chemicznej lub substancji odniesienia.
45. Lotne badane substancje chemiczne należy wstrzyknąć do szczelnie zamkniętych butli (pkt 47) za pomocą mikrostrzykawki. Dawkę oblicza się w oparciu o wstrzykniętą objętość oraz gęstość badanej substancji chemicznej.
46. W razie konieczności do naczyń należy dodać wody, aby uzyskać taką samą objętość cieczy w każdym naczyniu. Trzeba zagwarantować, że stosunek objętości fazy gazowej nad roztworem do objętości cieczy (zazwyczaj 1:2) i stężenie badanej substancji chemicznej były takie, by w fazie gazowej była dostępna wystarczająca ilość tlenu, aby umożliwić całkowitą biodegradację.
47. Następnie wszystkie butle szczelnie się zamyka, na przykład przykrywką z kauczuku butylowego i aluminiową nakrętką. Lotne badane substancje chemiczne należy dodać na tym etapie (pkt 45). Jeżeli spadek stężenia rozpuszczalnego węgla organicznego w roztworze testowym ma być monitorowany, a analizy czasu zerowego mają być przeprowadzone dla wstępnego stężenia węgla nieorganicznego (sterylnie kontrole, pkt 42) lub innych wyznaczników, należy odjąć odpowiednią próbkę z naczynia do badania. To naczynie do badania i jego zawartość następnie odrzuca się.
48. Szczelnie zamknięte butle umieszcza się na wytrząsarce obrotowej (pkt 15d), ustawiając wystarczającą szybkością wstrząsania, aby zawartość butli była dobrze wymieszana i utrzymywana w zawieszynie (np. 150–200 obr./min) i inkubuje w ciemności w temperaturze 20 °C, którą należy utrzymywać z maksymalnym odchyleniem ± 1 °C.

Pobieranie próbek

49. Schemat pobierania próbek będzie zależał od okresu zastoju i szybkości biodegradacji badanej substancji chemicznej w ujęciu kinetycznym. Butle są przeznaczane do analizy w dniu pobierania próbek, który powinien przypadać przynajmniej raz w tygodniu lub częściej (np. dwa razy w tygodniu), jeśli potrzebna jest pełna krzywa rozkładu. Wymaganą liczbę replikowanych butli, odpowiadających butlom F_T , F_B i F_C oraz F_I i F_S , jeżeli są używane, zabiera się z wytrząsarki (zob. pkt 42). Zazwyczaj badanie trwa 28 dni. Jeśli krzywa biodegradacji wskazuje na to, że plateau osiągnięto przed 28. dniem, wówczas badanie można zakończyć wcześniej niż 28. dnia. Należy pobrać próbki z pięciu butli przeznaczonych na 28. dzień badania do analizy i wykorzystać wyniki do obliczenia granic ufności lub współczynnika zmienności wartości procentowej biodegradacji. Z butli na potrzeby kontroli dotyczących hamowania i abiotycznego rozkładu nie trzeba pobierać próbek tak często jak z innych butli – wystarczy w 1. i 28. dniu.

Analiza węgla nieorganicznego

50. Wytwarzanie CO₂ w butlach określa się poprzez pomiar wzrostu stężenia węgla nieorganicznego podczas inkubacji. Istnieją dwie dostępne metody zalecane na potrzeby pomiaru ilości węgla nieorganicznego wytworzonej w ramach badania. Opisano je bezpośrednio poniżej. Ponieważ metody mogą dawać nieco odmienne wyniki, w jednej rundzie badania należy korzystać tylko z jednej z nich.
51. Metodę a) zaleca się, jeżeli żywność może zawierać pozostałości np. bibuły filtracyjnej z włókna szklanego lub nierozpuszczalną badaną substancję chemiczną. Analizę tę można wykonać za pomocą chromatografu gazowego, jeżeli analizator węgla jest niedostępny. Ważne jest, aby podczas analizy gazu z fazy gazowej nad roztworem temperatura butli była równa temperaturze badania lub zbliżona do niej. Metoda b) może być łatwiejsza dla laboratoriów wykorzystujących do pomiaru węgla nieorganicznego analizatory węglowe. Ważne jest, aby roztwór wodorotlenku sodu (pkt 21) używany do przekształcenia CO₂ w węglan był świeżo przygotowany lub by jego zawartość węgla nieorganicznego była znana, tak aby można było uwzględnić go przy obliczaniu wyników badania (zob. pkt 66-b).

Metoda a): zakwaszenie do pH < 3

52. Przed rozpoczęciem każdej partii analiz analizator węgla nieorganicznego jest kalibrowany przy użyciu odpowiedniej normy dotyczącej węgla nieorganicznego (np. 1 % w/w CO₂ w N₂). Stężony kwas ortofosforowy (pkt 20) wstrzykuje się przez korek każdej butli, z których pobiera się próbki, aby obniżyć pH żywności do < 3 (np. dodając 1 ml do 107 ml żywności do badania). Butle ponownie umieszcza się w wytrząsarce. Po godzinie wytrząsania w temperaturze badania butle są usuwane z wytrząsarki, podwielokrotności (np. 1 ml) gazu są pobierane z fazy gazowej nad roztworem w każdej butli i wstrzykiwane do analizatora węgla nieorganicznego. Zmierzone stężenia węgla nieorganicznego rejestruje się w mg C/l.
53. Zgodnie z zasadą tej metody po zakwaszeniu do pH < 3 i pozostawieniu do ustalenia stanu równowagi w temperaturze 20 °C stała równowagi rozmieszczenia CO₂ między fazami ciekłą a gazową w butlach do badania wynosi 1,0, jeżeli jest mierzona jako stężenie (13). Należy to co najmniej raz wykazać dla układu badawczego w następujący sposób:

Przygotować butle zawierające 5 i 10 mg/l węgla nieorganicznego, wykorzystując roztwór bezwodnego węglanu sodu (Na₂CO₃) w wolnej od CO₂ wodzie przygotowanej poprzez zakwaszenie wody do pH 6,5 za pomocą stężonego kwasu ortofosforowego (pkt 20), napowietrzenie przez noc powietrzem niezawierającym CO₂ i podniesienie pH do poziomu obojętnego za pomocą zasady. Należy dopilnować, aby stosunek objętości fazy gazowej nad roztworem do objętości cieczy był taki sam jak w badaniu (np. 1:2). Należy zakwaszyć i pozostawić do ustalenia stanu równowagi w sposób opisany w pkt 52, a następnie zmierzyć stężenie węgla nieorganicznego w fazie gazowej nad roztworem i w fazie ciekłej. Trzeba sprawdzić, czy oba stężenia są jednakowe w dopuszczalnych granicach błędów badania. Jeżeli nie, operator powinien dokonać przeglądu procedur. Tej kontroli rozmieszczenia węgla nieorganicznego pomiędzy fazami ciekłą i gazową nie trzeba przeprowadzać za każdym razem, gdy wykonuje się badanie. Przypuszczalnie można byłoby przeprowadzać ją podczas kalibracji.

54. Jeżeli ma zostać zmierzona usuwanie rozpuszczalnego węgla organicznego (wyłącznie w przypadku badanych substancji chemicznych rozpuszczalnych w wodzie), próbki należy pobrać z fazy ciekłej z oddzielnych (niezakwaszonych) butli, przefiltrować przez filtr membranowy i wstrzyknąć do analizatora rozpuszczalnego węgla organicznego. W razie konieczności można te butle wykorzystać do innych analiz, aby zmierzyć biodegradację pierwotną.

Metoda b): przekształcenie CO₂ w węglan

55. Przed każdą serią analiz analizator węgla nieorganicznego jest kalibrowany przy użyciu odpowiedniej normy - na przykład roztworu wodorowęglanu sodu (NaHCO₃) w wodzie wolnej od CO₂ (zob. pkt 53) w przedziale od 0 do 20 mg/l jako węgiel nieorganiczny. Roztwór wodorotlenku sodu (7M, pkt 21) (np. 1 ml na 107 ml żywności) wstrzykuje się przez przykrywkę każdej butli, z których pobiera się próbki, a butle wytrząsa się przez godzinę w temperaturze badania. Należy użyć tego samego roztworu NaOH na wszystkich butlach przeznaczonych na określony dzień, lecz niekoniecznie podczas każdego pobierania próbek w czasie trwania badania. Jeżeli przy każdym pobieraniu próbek potrzebne są bezwzględne ślepe wartości węgla nieorganicznego, oznaczanie węgla nieorganicznego w roztworze NaOH będzie niezbędne przy każdym użyciu tego roztworu. Butle wyjmuje się z wytrząsarki i odstawia do ustalenia. Z każdego naczynia pobiera się strzykawką odpowiednio objętości (np. 50 do 1 000 µl) fazy ciekłej. Próbkę wstrzykuje się do analizatora węgla nieorganicznego i rejestruje stężenia. Należy dopilnować, aby używany analizator był odpowiednio wyposażony do analizowania próbek zasadowych otrzymywanych w ramach tej metody.
56. Zgodnie z zasadą tej metody po dodaniu zasady i wytrząsaniu stężenie węgla nieorganicznego w fazie gazowej nad roztworem jest nieznaczne. Należy to co najmniej raz skontrolować dla układu badawczego, stosując normy dotyczące węgla nieorganicznego, poprzez dodanie zasady, pozostawienie do ustalenia stanu równowagi i zmierzenie stężenia węgla nieorganicznego w fazie gazowej nad roztworem i w fazie ciekłej (zob. pkt 53). Stężenie w fazie gazowej nad roztworem powinno być zbliżone do zera. Tej kontroli praktycznie całkowitej absorpcji CO₂ nie trzeba przeprowadzać za każdy razem, gdy przeprowadza się badanie.
57. Jeżeli ma zostać zmierzona usuwanie rozpuszczalnego węgla organicznego (wyłącznie w przypadku badanych substancji chemicznych rozpuszczalnych w wodzie), próbki należy pobrać z fazy ciekłej z oddzielnych (niezakwaszonych dodatku zasady) butli, przefiltrować przez filtr membranowy i wstrzyknąć do analizatora rozpuszczalnego węgla organicznego. W razie konieczności można te butle wykorzystać do innych analiz, aby zmierzyć biodegradację pierwotną.

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Obliczanie wyników

58. Przy założeniu 100 % mineralizacji badanej substancji chemicznej na CO₂, nadwyżka ThIC wytworzonego w ślepych próbach kontrolnych jest równa TOC dodanemu do każdej butli do badania na początku badania, czyli:

$$\text{ThIC} = \text{TOC}$$

Całkowita masa (mg) nieorganicznego węgla (TIC) w każdej butli wynosi:

$$\text{TIC} = (\text{mg C w płynie} + \text{mg C w fazie gazowej nad roztworem}) = (V_L \times C_L) + (V_H \times C_H) \quad \text{równanie [1]}$$

gdzie:

V_L = objętość płynu w butli (w litrach),

C_L = stężenie IC w płynie (mg/l w przeliczeniu na węgiel),

V_H = objętość fazy gazowej nad roztworem (w litrach),

C_H = stężenie IC w fazie gazowej nad roztworem (mg/l w przeliczeniu na węgiel).

Obliczenia TIC na potrzeby dwóch metod analitycznych stosowanych do pomiaru węgla nieorganicznego w opisanym tu badaniu omówiono w pkt 60 i 61 poniżej. Procentową biodegradację (% D) w każdym przypadku uzyskuje się w następujący sposób:

$$\%D = \frac{(\text{TIC}_t - \text{TIC}_b)}{\text{TOC}} \times 100 \quad \text{równanie [2]}$$

gdzie:

TIC_t = mg TIC w butli do badania w czasie t,

TIC_b = średni mg TIC w butlach zawierających próby ślepe w czasie t,

TOC = mg TOC dodany na początku badania do naczynia do badania.

Procentową biodegradację % D oblicza się dla butli do badania (F_T), butli odniesienia (F_C) oraz, jeśli zastosowano, butli do monitorowania działania hamującego (F_I), na podstawie odpowiednich ilości TIC wytworzonego do czasu każdego pobierania próbek.

59. W przypadku znaczącego wzrostu zawartości TIC w kontrolach sterylnych (F_S) w czasie trwania badania można uznać, że zaszedł abiotyczny rozkład badanej substancji chemicznej i należy to uwzględnić w obliczeniach D w równaniu [2].

Zakwaszanie do pH < 3

60. Jako że zakwaszenie do pH < 3 i ustalenie równowagi skutkują wyrównaniem się stężenia TIC w fazie płynnej i gazowej, jedynie stężenie IC w fazie gazowej wymaga pomiaru. Tym samym z równania [1] $\text{TIC} = (V_L + V_H) \times C_H = V_B \times C_H$, gdzie V_B = objętość butli z surowicą.

Przekształcenie CO₂ w węgiel

61. W ramach tej metody obliczenia wykonuje się tak jak w równaniu [1], ale nie uwzględnia się nieznacznej ilości IC w fazie gazowej, czyli $V_H \times C_H = 0$, a $TIC = V_L \times C_L$.

Prezentacja wyników

62. Krzywą biodegradacji uzyskuje się poprzez wykreślenie procentowej biodegradacji D w czasie inkubacji oraz, jeśli jest to możliwe, wskazuje się fazę zastoju, fazę biodegradacji, 10-dniowe »okno« i fazę plateau, czyli fazę, w której osiągnięto maksymalny rozkład, a krzywa biodegradacji wyrównała się. Jeśli uzyskano porównywalne wyniki dla równoległych naczyń do badania F_T (& 20 % różnicy), wykreśla się średnią krzywą (zob. dodatek 2, rysunek 1); jeśli nie – wykreśla się krzywe dla każdego naczynia. Określa się średnią wartość procentowej biodegradacji w fazie plateau lub dokonuje się oszacowania najwyższej wartości (np. kiedy krzywa spada w fazie plateau), ale istotne jest, by mieć na uwadze, że w tym drugim przypadku wartość ta nie może być wartością odstającą. W sprawozdaniu z badania należy wskazać maksymalny stopień biodegradacji jako »stopień biodegradacji badanej substancji chemicznej«. Jeśli liczba naczyń do badania nie była wystarczająca do wskazania fazy plateau, zmierzone dane z ostatniego dnia badania wykorzystuje się do obliczenia wartości średniej. Taka ostatnia wartość, będąca średnią pięciu replikatów, pozwala na wskazanie dokładności, z jaką określono wartość procentową biodegradacji. Należy także przedstawić wartość uzyskaną na koniec okresu 10-dniowego »okna«.
63. W taki sam sposób wykreśla się krzywą dla substancji odniesienia, F_C, oraz, jeśli je zastosowano, kontroli eliminacji abiotycznej, F_S, i kontroli działania hamującego, F_I.
64. Ilości TIC obecne w ślepych próbach kontrolnych (F_B) odnotowuje się jako te w kolbach F_S (kontrola abiotyczna), jeśli takie naczynia uwzględniono w badaniu.
65. Należy obliczyć D dla naczyń F_I, w oparciu o teoretyczny wynik IC spodziewany jedynie ze składnika odniesienia mieszaniny. Jeśli, w dniu 28. $[(D_{FC}^{(1)} - D_{FI}^{(2)})/D_{FC}] \times 100 > 25 \%$, można założyć, że badana substancja chemiczna zahamowała działanie inokulum, co może wiązać się z niskimi wartościami D_{FT} uzyskanymi w warunkach badania. W takim przypadku badanie można powtórzyć z wykorzystaniem niższego badanego stężenia, a najlepiej zmniejszając DIC w inokulum oraz TIC powstały w ślepych próbach kontrolnych, jako że w przeciwnym wypadku mniejsze stężenie zmniejszy dokładność metody. Można także wykorzystać inne inokulum. Jeśli w butelkach F_S (abiotyczne) obserwuje się znaczny wzrost (> 10 %) ilości TIC, mogły zajść procesy rozkładu abiotycznego.

Ważność wyników

66. Badanie uznaje się za ważne, jeśli:
- średni procentowy rozkład w naczyniach F_C zawierających substancję odniesienia wynosi > 60 % do 14. dnia inkubacji; oraz
 - średnia ilość TIC obecnego w ślepych próbach kontrolnych F_B na koniec badania wynosi > 3 mg C/l.

Jeśli te pułapy nie zostały osiągnięte, badanie należy powtórzyć z wykorzystaniem inokulum z innego źródła lub należy dokonać przeglądu procedur. Na przykład, jeśli problem stanowi wysoka wartość IC wytworzonego w ślepej próbie, należy zastosować procedurę opisaną w pkt 27–32.

67. Jeśli badana substancja chemiczna nie osiąga 60 % ThIC oraz wykazano, że nie ma działania hamującego (pkt 65), badanie można powtórzyć ze zwiększonym stężeniem inokulum (do 30 mg/l osadu czynnego i 100 ml wcieku/l) lub inokulami z innych źródeł, zwłaszcza jeśli rozkład mieścił się w przedziale 20 do 60 %.

Interpretacja wyników

68. Biodegradacja > 60 % ThIC w ciągu 10-dniowego »okna« w opisanym tu badaniu pokazuje, że badana substancja chemiczna ulega szybkiej biodegradacji w warunkach tlenowych.
69. Jeśli nie osiągnięto wartości progowej 60 % ThIC, należy określić wartość pH w pożywkach w butlach, których odczynu nie zmieniono na kwaśny ani zasadowy; wartość poniżej 6,5 może wskazywać, że doszło do nityfikacji. W takim przypadku badanie należy powtórzyć z zastosowaniem roztworu buforowego o wyższym stężeniu.

(1) Procentowy rozkład w naczyniu F_C zawierającym substancję odniesienia.

(2) Procentowy rozkład w naczyniu F_I.

Sprawozdanie z badania

70. Należy sporządzić tabelę z % D dla każdej butli do badania (F_T), butli odniesienia (F_D) oraz, jeśli zastosowano, kontrolnej butli działania hamującego (F_H) dla każdego dnia pobierania próbek. Jeśli dla butli z replikatami uzyskano porównywalne wyniki, należy wykreślić krzywą średniej % D w czasie. Należy odnotować wartości TIC w ślepych próbach kontrolnych (F_B) oraz w sterylnych próbach kontrolnych (F_S), a także DOC lub inne wyznaczniki oraz ich procentowe usuwanie.
71. Należy określić średnią wartość % D w fazie plateau lub zastosować najwyższą wartość, jeśli krzywa biodegradacji spada w fazie plateau, oraz przedstawić ją jako »stopień biodegradacji badanej substancji chemicznej«. Ważne, by upewnić się, że w drugim przypadku najwyższa wartość nie jest wartością odstającą.
72. Sprawozdanie z badania musi zawierać następujące informacje:

Badana substancja chemiczna

- nazwa zwyczajowa, nazwa chemiczna, numer w rejestrze CAS, wzór strukturalny i istotne właściwości fizykochemiczne,
- czystość (zanieczyszczenia) badanej substancji chemicznej.

Warunki badania

- odniesienie do niniejszej metody badawczej,
- opis zastosowanego układu badawczego (np. objętość naczynia, stosunek przestrzeni nadpowierzchniowej do płynu, metoda mieszania itp.),
- wprowadzenie badanej substancji chemicznej oraz substancji odniesienia do układu badawczego; zastosowane badane stężenie i ilość węgla dawkowana do każdej butli do badania, wszelkie zastosowane rozpuszczalniki,
- szczegółowe informacje na temat zastosowanego inokulum, wszelkiego wstępnego poddawania działaniu substancji i wstępnego przygotowywania,
- temperatura inkubacji,
- walidacja zasady analizy IC,
- główne cechy charakterystyczne zastosowanego analizatora IC (oraz wszelkie inne zastosowane metody analityczne),
- liczba replikatów.

Wyniki

- dane surowe i obliczone wartości dotyczące biodegradowalności w formie tabeli,
- wykres procentowego rozkładu w czasie dotyczący badanej substancji chemicznej i substancji odniesienia, faza zastoju, faza rozkładu, 10-dniowe »okno« oraz nachylenie krzywej,
- procentowe usuwanie w fazie plateau, na koniec badania oraz po okresie 10-dniowego »okna«,
- uzasadnienie w przypadku ewentualnego odrzucenia wyników badania,
- wszelkie inne fakty, które są istotne dla przeprowadzonej procedury,
- omówienie wyników.

BIBLIOGRAFIA:

- (1) Rozdział C.4 niniejszego załącznika: Oznaczenie biodegradowalności – badanie wydzielania CO₂ (metoda C.4-C).
- (2) Sturm RN (1973). Biodegradability of Nonionic surfactants: screening test for predicting rate and ultimate biodegradation. *J. A. Oil Chem. Soc.* 50: 159-167.
- (3) Larson RJ (1979). Estimation of biodegradation potential of xenobiotic organic chemicals. *Appl Env. Microbiol.* 38: 1153–1161.
- (4) Larson RJ, Hansmann MA i Bookland EA (1996). Carbon dioxide recovery in ready biodegradability tests: mass transfer and kinetic constants, *Chemosphere* 33: 1195-1210.
- (5) ISO 9439 (1990; zmienione w 1999). Water Quality – Evaluation of ultimate aerobic biodegradability of organic compounds in aqueous medium – Carbon dioxide evolution Test (Sturm).
- (6) US EPA (1996). Fate, Transport and Transformation Test Guideline. 835. 3110 Carbon dioxide evolution test. Office, Prevention Pesticides and Toxic Substances Washington, DC.
- (7) US EPA (1996). Fate, Transport and Transformation Test Guideline. 835. 3100. Aerobic aquatic biodegradation. Office, Prevention Pesticides and Toxic Substances Washington, DC.
- (8) Gledhill WE (1975). Screening test for assessment of biodegradability: Linear alkyl benzene sulfonate. *Appl Microbiol.* 30: 922–929.
- (9) Weytjens D, Van Ginneken I i Painter HA (1994). The recovery of carbon dioxide in the Sturm test for ready biodegradability. *Chemosphere* 28: 801–812.
- (10) Ennis DM i Kramer A (1975). A rapid microtechnique for testing biodegradability of nylons and polyamides. *J. Food Sci.* 40: 181–185.
- (11) Ennis DM, Kramer A, Jameson CW, Mazzoccki PH and Bailey PH (1978). *Appl. Env. Microbiol.* 35: 51–53.
- (12) Boatman RJ, Cunningham SL i Ziegler DA (1986). A method for measuring the biodegradation of organic chemicals, *Env. Toxicol. Chem.* 5: 233–243.
- (13) Struijs J i Stoltenkamp J (1990). Head space determination of evolved carbon dioxide in a biodegradability screening test. *Ecotox. Env. Safety* 19: 204–211.
- (14) Birch RR i Fletcher RJ (1991). The application of dissolved inorganic carbon measurements to the study of aerobic biodegradability. *Chemosphere* 23: 507–524.
- (15) Birch RR, Biver C, Campagna R, Gledhill WE, Pagga U, Steber J, Reust H, i Bontinck WJ (1989). Screening of chemicals for anaerobic biodegradation. *Chemosphere* 19: 1527–1550.
- (16) ISO 14593, (1999) Water Quality - Evaluation of ultimate aerobic biodegradability of organic compounds in an aerobic medium-method by analysis of inorganic carbon in sealed vessels (CO₂ headspace test).
- (17) Battersby NS (1997). The ISO headspace CO₂ biodegradation test, *Chemosphere* 34: 1813–1822.
- (18) US EPA (1996). Fate, Transport and Transportation. 835.3120. Sealed vessel carbon dioxide production test. Office, Prevention Pesticides and Toxic Substance Washington, DC.
- (19) Battersby NS, Ciccognani D, Evans MR, King D, Painter HA, Peterson DR i Starkey M (1999). An »inherent« biodegradability test for oil products: description and results of an international ring test. *Chemosphere* 38: 3219–3235.

-
- (20) Rozdział C.4 niniejszego załącznika: Oznaczenie biodegradowalności.
- (21) OECD (1988). OECD Ring-test of methods for determining ready biodegradability: Chairman's report (M. Hashimoto; MITI) and final report (M. Kitano i M. Takatsuki; CITI). Paryż.
- (22) Rozdział 11 niniejszego załącznika, Badanie zahamowania oddychania osadu czynnego.
- (23) Struijs J, Stoltenkamp-Wouterse MJ i Dekkers ALM (1995). A rationale for the appropriate amount of inoculum in ready biodegradability tests. *Biodegradation* 6: 319–327.
- (24) UE (1999). Ring-test of the ISO Headspace CO₂ method: application to surfactants: Surfactant Ring Test-1, Report EU4697, Water Research Centre, May 1999, Medmenham, SL7 2HD, Zjednoczone Królestwo.
- (25) ISO 10634 (1996) Water Quality – Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium.
-

Dodatek 1

SKRÓTY I DEFINICJE

IC: węgiel nieorganiczny

ThCO₂: teoretyczny dwutlenek węgla (mg) to ilość dwutlenku węgla obliczona jako wytworzona ze znanej lub zmierzonej zawartości węgla w badanej substancji chemicznej, przy pełnej mineralizacji; wyrażana także jako mg dwutlenku węgla wydzielonego na mg badanej substancji chemicznej.

DOC: rozpuszczony węgiel organiczny to węgiel organiczny obecny w roztworze lub taki, który przechodzi przez filtr o średnicy 0,45 mikrometra lub pozostaje w supernatancie po odwirowaniu przy ok. 4 000 g (około 40 000 m sec⁻²) przez 15 min.

DIC: rozpuszczony węgiel nieorganiczny

ThIC: teoretyczny węgiel nieorganiczny

TIC: całkowity węgiel nieorganiczny

Ulegający szybkiej biodegradacji: arbitralna klasyfikacja substancji chemicznych, które spełniają kryteria pewnych określonych badań przesiewowych dotyczących ostatecznej biodegradacji; badania te są tak rygorystyczne, iż zakłada się, że takie substancje chemiczne szybko i w pełni ulegną biodegradacji w środowisku wodnym w warunkach tlenowych.

10-dniowe »okno«: 10 dni bezpośrednio po osiągnięciu 10 % biodegradacji.

Biodegradowalność naturalna: klasyfikacja substancji chemicznych, w przypadku których istnieją jednoznaczne dowody na biodegradację (pierwotną lub ostateczną) wynikające z jakiegokolwiek badania biodegradowalności.

Ostateczna biodegradacja tlenowa: stopień rozkładu osiągnięty, kiedy badana substancja chemiczna jest w pełni zutylizowana przez mikroorganizmy w wyniku wytwarzania dwutlenku węgla, wody, soli mineralnych i nowych elementów komórek (biomasa).

Mineralizacja: całkowity rozkład organicznej substancji chemicznej na CO₂ i H₂O w warunkach tlenowych, oraz na CH₄, CO₂ i H₂O w warunkach beztlenowych.

Faza zastoju: czas od początku badania do czasu aklimatyzacji lub adaptacji mikroorganizmów rozkładających oraz do czasu zwiększenia się stopnia biodegradacji badanej substancji chemicznej lub materii organicznej do wykrywalnego poziomu (np. 10 % maksymalnej teoretycznej biodegradacji lub mniej, w zależności od dokładności techniki pomiaru).

Faza rozkładu: czas od zakończenia okresu zastoju do czasu osiągnięcia 90 % maksymalnego stopnia rozkładu.

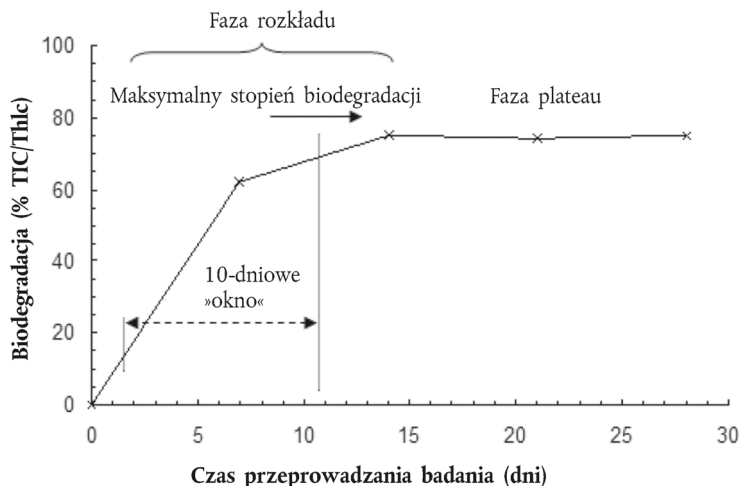
Faza plateau: faza, podczas której osiągnięto maksymalny rozkład, a krzywa biodegradacji wyrównała się.

Badana substancja chemiczna: jakakolwiek substancja lub mieszanina badana za pomocą niniejszej metody badawczej.

Dodatek 2

Przykładowa krzywa biodegradacji

Rysunek 1

Biodegradacja 1-oktanolu w ramach badania CO₂ w fazie gazowej nad roztworem

Glosariusz:

Biodegradacja

Faza rozkładu

Maksymalny stopień biodegradacji

Faza plateau

10-dniowe »okno«

Czas przeprowadzania badania (dni)

C. 30. BIOAKUMULACJA W SKĄPOSZCZETACH LĄDOWYCH

WSTĘP

1. Niniejsza metoda badawcza jest równoważna metodzie opisanej w dotyczącej badań wytycznej OECD nr 317 (OECD TG 317) (2010). W odniesieniu do metod badawczych dotyczących wpływu na środowisko metodę »Bioakumulacja: badanie ryb w warunkach przepływu« (rozdział C.13 niniejszego załącznika (49)) oraz metodę »Bioakumulacja w bentosowych skąposzczetach żyjących w osadzie« (53) opublikowano odpowiednio w 1996 i 2008 r. Ekstrapolacja danych dotyczących bioakumulacji w gatunkach wodnych na organizmy lądowe, takie jak dżdżownice, jest trudna, a często w ogóle niemożliwa. Do oceny bioakumulacji substancji chemicznych w glebie stosuje się obecnie modele obliczeniowe oparte na lipofilności badanej substancji chemicznej, np. (14) (37), na przykład w wytycznych technicznych UE (19). Potrzeba opracowania metody badawczej specyficznej dla danego ustroju została już poruszona, np. (55). Taka metoda jest w szczególności istotna w ocenie zatrucia wtórnego w lądowych łańcuchach pokarmowych (4). Istnieje kilka krajowych metod badawczych, za pomocą których bada się kwestię bioakumulacji w organizmach innych niż ryby, np. (2) i (72). Metodę pomiaru bioakumulacji z zanieczyszczonych gleb w dżdżownicach (*Eisenia fetida*, Savigny) i wazonkowcowatych opracowało Amerykańskie Stowarzyszenie Badań i Materiałów (ASTM) (3). Uznana na scenie międzynarodowej metoda określania bioakumulacji w glebie wzbogaconej zwiększy efektywność oceny ryzyka związanego z obecnością substancji chemicznych w ekosystemach lądowych, np. (25) (29).
2. Bezkręgowce spożywające glebę są narażone na związane w glebie substancje chemiczne. Wśród takich zwierząt są skąposzczety lądowe, które odgrywają ważną rolę dla struktury i funkcji gleb (15) (20). Skąposzczety lądowe żyją w glebie i częściowo na powierzchni gleby (zwłaszcza w ściółce); często stanowią najliczniejszą grupę gatunków w biomasie (54). Przyczyniając się do bioturacji gleby oraz stanowiąc żer dla innych zwierząt, zwierzęta te mogą mieć silny wpływ na biodostępność substancji chemicznych dla innych organizmów, takich jak bezkręgowce (np. drapieżne roztocza i chrząszcze; np. (64)) lub drapieżniki z grupy kręgowców (np. lisy i mewy) (18) (62). Niektóre gatunki skąposzczetów lądowych wykorzystywane obecnie w badaniach ekotoksykologicznych opisano w dodatku 5.

3. W opracowanym przez ASTM standardowym przewodniku dotyczącym przeprowadzania badań laboratoryjnych toksyczności i bioakumulacji w glebie z wykorzystaniem gatunku z rodziny dżdżownicowatych *Eisenia fetida* oraz gatunku z rodziny wazonkowcowatych *Enchytraeus albidus* (3) przedstawiono wiele ważnych i użytecznych szczegółowych informacji na temat wyników niniejszej metody badawczej dotyczącej bioakumulacji w glebie. Inne dokumenty, do których odniesienia zawiera niniejsza metoda badawcza, to rozdział C.13 niniejszego załącznika »Biokoncentracja: badanie ryb w warunkach przepływu« (49) oraz OECD TG 315 »Bioakumulacja w bentosowych skąposzczetach żyjących w osadzie« (53). Ważnymi źródłami informacji na temat niniejszej metody badawczej są również praktyczne doświadczenia dotyczące badań nad bioakumulacją w glebie opisane w literaturze, np. (1) (5) (11) (12) (28) (40) (43) (45) (57) (59) (76) (78) (79).
4. Niniejsza metoda badawcza może w większości przypadków być stosowana w odniesieniu do stabilnych, neutralnych organicznych substancji chemicznych, które ulegają adsorpcji do gleb. Za pomocą niniejszej metody badawczej możliwe jest badanie pod kątem bioakumulacji wiązanych w glebie, stabilnych związków metaloorganicznych. Metoda ta ma zastosowanie również w przypadku metali i innych pierwiastków śladowych.

WARUNEK KONIECZNY

5. Badania pomiaru bioakumulacji substancji chemicznej w skąposzczetach lądowych przeprowadza się z wykorzystaniem metali ciężkich (zob. np. (63)) oraz trwałych organicznych substancji chemicznych o wartościach $\log K_{ow}$ pomiędzy 3,0 a 6,0, np. (40). Takie badania mają także zastosowanie do:
 - substancji chemicznych o $\log K_{ow}$ powyżej 6,0 (super-hydrofobowe substancje chemiczne),
 - substancji chemicznych, które należą do klasy organicznych substancji chemicznych, o których wiadomo, że mają zdolność do bioakumulacji w żywych organizmach, np. substancji powierzchniowo czynnych lub wysoce adsorpcyjnych,
 - substancji chemicznych, które wskazują na zdolność do bioakumulacji z racji właściwości strukturalnych, np. analogi substancji chemicznych, o których wiadomo, że mają zdolność do bioakumulacji, oraz
 - metali.
6. Informacje na temat badanej substancji chemicznej, takie jak nazwa zwyczajowa, nazwa chemiczna (najlepiej nazwa IUPAC), wzór strukturalny, numer w rejestrze CAS, czystość, środki ostrożności, odpowiednie warunki przechowywania oraz metody analityczne, należy uzyskać przed rozpoczęciem badania. Ponadto znane powinny być następujące informacje:
 - a) rozpuszczalność w wodzie;
 - b) współczynnik podziału oktanol/woda, K_{ow} ;
 - c) współczynnik podziału gleba-woda, wyrażony jako K_{oc} ;
 - d) prężność par;
 - e) podatność na rozkład (np. w glebie, wodzie);
 - f) znane metabolity.
7. Można zastosować badane substancje chemiczne znakowane izotopowo lub nieznakowane izotopowo. Aby ułatwić analizę, zaleca się jednak stosowanie substancji chemicznej znakowanej izotopowo. Taką decyzję należy podjąć na podstawie granic wykrywalności lub wymogu pomiaru macierzystej badanej substancji chemicznej i metabolitów. Jeśli stosuje się badaną substancję chemiczną znakowaną izotopowo i dokonuje się pomiaru całkowitych pozostałości radioaktywnych, ważne jest, by znakowane izotopowo pozostałości, zarówno w glebie, jak i w organizmach badanych, zostały scharakteryzowane pod kątem procentowej zawartości macierzystej badanej substancji chemicznej i znakowanej niemacierzystej substancji chemicznej, np. w próbkach pobranych w stanie ustalonym lub pod koniec etapu absorpcji, w celu umożliwienia obliczenia współczynnika bioakumulacji dla macierzystej badanej substancji chemicznej i danych metabolitów w glebie (zob. pkt 50). Konieczne może być zmodyfikowanie opisanej tu metody, np. w celu zapewnienia wystarczającej biomasy, na potrzeby pomiaru nieznakowanych izotopowo organicznych badanych substancji chemicznych lub metali. Przy pomiarze całkowitych pozostałości radioaktywnych (za pomocą scyntylacyjnego licznika cieczowego po ekstrakcji, spaleniu lub rozpuszczeniu tkanek) współczynnik bioakumulacji określa się na podstawie macierzystej badanej substancji chemicznej i metabolitów. Współczynnik bioakumulacji należy obliczyć na podstawie stężenia macierzystej badanej substancji chemicznej w organizmach oraz całkowitych pozostałości radioaktywnych. Następnie na podstawie współczynnika bioakumulacji należy obliczyć współczynnik akumulacji biota-gleba, znormalizowany do zawartości lipidów organizmu oraz zawartości węgla organicznego w glebie, aby zapewnić porównywalność wyników z różnych badań bioakumulacji.

8. Toksyczność badanej substancji chemicznej dla gatunków wykorzystanych w badaniu powinna być znana, np. stężenie efektywne (EC_x) lub stężenie śmiertelne (LC_x) dla okresu etapu absorpcji (np. (19)). Wybrane stężenie badanej substancji chemicznej powinno wynosić około 1 % jej ostrego bezobjawowego LC₅₀, oraz powinno być co najmniej dziesięciokrotnie wyższe niż jej granica wykrywalności w glebie dla zastosowanej metody analitycznej. Preferowanymi wartościami dotyczącymi toksyczności są wartości pozyskane z długoterminowych badań nad subletalnymi punktami końcowymi (51) (52), jeśli takie dane są dostępne. Jeśli jednak nie są one dostępne, pomocnych informacji dostarczy badanie toksyczności ostrej (zob. np. (23)).
9. Dostępna powinna być odpowiednia metoda analityczna o znanej dokładności, precyzji oraz czułości w celu oznaczenia ilościowego substancji chemicznej w badanych roztworach, w glebie oraz w materiale biologicznym, wraz ze szczegółowymi informacjami na temat przygotowania i przechowywania próbek oraz kartami charakterystyki materiałów. Znane powinny być także analityczne granice wykrywalności jednostki badanej w glebie oraz tkance organizmów. Jeśli stosuje się badaną substancję chemiczną znakowaną węglem ¹⁴C, znana powinna być promieniotwórczość właściwa (np. Bq mol⁻¹) oraz odsetek promieniotwórczości związany z zanieczyszczeniami. Promieniotwórczość właściwa badanej substancji chemicznej powinna być dostatecznie wysoka, aby ułatwić analizę, zaś stężenia badane nie powinny wywoływać skutków toksycznych.
10. Badanie można przeprowadzić z wykorzystaniem gleby sztucznej lub gleb naturalnych. Informacje na temat cech charakterystycznych zastosowanej gleby naturalnej, np. pochodzenia gleby lub jej składników, pH, zawartości węgla organicznego, rozkładu wielkości cząstek (procent piasku, iłu i gliny) oraz zdolności zatrzymywania wody, powinny być znane przed rozpoczęciem badania (3) (48).

ZASADA BADANIA

11. Parametry, które charakteryzują bioakumulację badanej substancji chemicznej obejmują współczynnik bioakumulacji (BAF), stałą szybkości absorpcji (k_a) oraz stałą szybkości eliminacji (k_e). Ich definicje podano w dodatku 1.
12. Badanie składa się z dwóch etapów: etapu absorpcji (narażenia) i etapu eliminacji (po narażeniu). Podczas etapu absorpcji replikaty z grupami organizmów poddaje się narażeniu poprzez glebę, którą wzbogacono badaną substancją chemiczną. Oprócz zwierząt badanych, w identycznych warunkach niezawierających jednak badanej substancji chemicznej przetrzymuje się grupy organizmów kontrolnych. Mierzy się masę suchą i zawartość lipidów organizmów badanych. Pomiarów można przeprowadzić z wykorzystaniem organizmów z grupy kontrolnej. Wartości dotyczące analizy tła (ślepa próba) można uzyskać poprzez analizę próbek organizmów kontrolnych i gleby. Na potrzeby etapu eliminacji organizmy przenosi się do gleby niezawierającej badanej substancji chemicznej. Etap eliminacji jest zawsze wymagany, chyba że absorpcja badanej substancji chemicznej podczas etapu narażenia nie była znacząca. Etap eliminacji dostarcza informacji na temat szybkości, z jaką badana substancja chemiczna jest wydalana przez organizmy badane (np. (27)). Jeśli podczas etapu absorpcji nie osiągnięto stanu ustalonego, parametry kinetyczne – kinetyczny współczynnik bioakumulacji (BAFK), stałą lub stałe szybkości absorpcji i eliminacji – należy określić w oparciu o jednoczesne dopasowanie wyników z etapu absorpcji i eliminacji. Stężenie badanej substancji chemicznej w/na organizmach monitoruje się w trakcie obydwu etapów badania.
13. Podczas etapu absorpcji pomiarów dokonuje się w chwili pobierania próbek przez okres trwający do 14 dni (w przypadku wazonkowcowatych) lub 21 dni (w przypadku dżdżownic), do czasu osiągnięcia stanu ustalonego (11) (12) (67). Stan ustalony zachodzi, gdy wykres stężenia w organizmach w czasie jest równoległy do osi czasu, a trzy następujące po sobie analizy stężenia wykonane na próbkach pobranych w odstępach czasowych co najmniej dwóch dni nie różnią się od siebie więcej niż o $\pm 20\%$ na podstawie porównań statystycznych (np. analiza wariancji, analiza regresji).
14. Etap eliminacji składa się z przeniesienia organizmów badanych do naczyń z takim samym podłożem, lecz niezawierającym badanej substancji chemicznej. Podczas etapu eliminacji pomiarów dokonuje się w chwili pobierania próbek przez 14 dni (w przypadku wazonkowcowatych) lub 21 dni (w przypadku dżdżownic), o ile wcześniej oznaczenie analityczne nie wykaże redukcji pozostałości badanej substancji chemicznej w organizmach na poziomie 90 %. Stężenie badanej substancji chemicznej w organizmach pod koniec etapu eliminacji przedstawia się w sprawozdaniu jako niewyeliminowane pozostałości. Współczynnik bioakumulacji w stanie ustalonym (BAF_{ss}) należy obliczać zarówno jako stosunek stężenia w organizmach (Ca) i w glebie (Cs) przy ewidentnym stanie ustalonym, jak i jako kinetyczny współczynnik bioakumulacji (BAFK), czyli stosunek stałej szybkości absorpcji z gleby (k_a) oraz stałej szybkości eliminacji (k_e) (zob. definicje w dodatku 1), przy założeniu kinetyki reakcji pierwszego rzędu (zob. obliczenia w dodatku 2). Jeśli w sposób ewidentny kinetyka reakcji pierwszego rzędu nie znajduje zastosowania, należy zastosować inne modele.
15. Stała szybkości absorpcji, stała szybkości eliminacji (lub stałe, jeśli zastosowano inne modele), kinetyczny współczynnik bioakumulacji (BAFK) oraz, tam, gdzie to możliwe, granice ufności każdego z tych parametrów, oblicza się za pomocą komputerowych modeli równań (zob. wytyczne w dodatku 2). Odpowiedniość dopasowania modelu można określić na podstawie, na przykład, współczynnika korelacji lub współczynnika determinacji (współczynniki o wartościach zbliżonych do 1 wskazują na dobre dopasowanie) lub chi-kwadrat. Zakres błędu standardowego lub granicy ufności dla szacowanych parametrów także może wskazywać na odpowiedniość dopasowania modelu.
16. Aby zmniejszyć zróżnicowanie wyników badania dla badanych substancji chemicznych o wysokim poziomie lipofilności, współczynniki bioakumulacji należy wyrazić w odniesieniu do zawartości lipidów oraz węgla organicznego (kg węgla organicznego w glebie kg⁻¹ zawartości lipidów w organizmie). Takie podejście wynika z faktu, że w przypadku niektórych klas substancji chemicznych istnieje wyraźne powiązanie między zdolnością

do bioakumulacji a lipofilnością; zostało to potwierdzone w przypadku ryb (47). Istnieje związek między zawartością lipidów w rybach a bioakumulacją takich substancji chemicznych. W przypadku organizmów bentosowych stwierdzono podobne korelacje, np. (30) (44). Taką korelację wykazano także w przypadku skąposzczetów lądowych, np. (5) (6) (7) (14). Jeśli dostępna jest wystarczająca ilość tkanek organizmów, zawartość lipidów w zwierzętach badanych można określić z wykorzystaniem tego samego materiału biologicznego, który zastosowano do określenia stężenia badanej substancji chemicznej. Do pomiaru zawartości lipidów można wykorzystać także zwierzęta kontrolne.

WAŻNOŚĆ BADANIA

17. Aby badanie było ważne, grupy kontrolne oraz grupy poddane działaniu substancji muszą spełnić następujące kryteria:
 - pod koniec badania całkowita śmiertelność podczas etapu absorpcji i etapu eliminacji nie powinna przekroczyć 10 % (w przypadku dżdżownic) lub 20 % (w przypadku wazonkowcowatych) całkowitej liczby organizmów wykorzystanych w badaniu,
 - w przypadku gatunków *Eisenia fetida* i *Eisenia andrei* średnia strata masy według pomiarów na koniec etapu absorpcji i na koniec etapu eliminacji nie powinna przekroczyć 20 % w porównaniu z początkową żywą wagą na początku każdego z etapów.

OPIS METODY

Badane gatunki

18. Do badania bioakumulacji zaleca się wykorzystanie kilku gatunków skąposzczetów lądowych. Najczęściej stosowane gatunki, *Eisenia fetida* lub *Eisenia andrei* (dżdżownicowate), lub też *Enchytraeus albidus*, *Enchytraeus crypticus* lub *Enchytraeus luxuriosus* (wazonkowcowate), opisano w dodatku 5.

Przyrządy

19. Należy dołożyć starań, aby unikać stosowania materiałów, w odniesieniu do wszystkich części sprzętu, które mogą rozpuścić badaną substancję chemiczną, sprawić, że ulegnie ona adsorpcji, lub też wypłukać inne substancje chemiczne, a także materiałów, które mają szkodliwe działanie na zwierzęta badane. Można zastosować standardowe prostokątne lub cylindryczne naczynia, wykonane z chemicznie obojętnego materiału i posiadające odpowiednią pojemność, zgodnie ze wskaźnikiem obciążenia, tj. liczbą organizmów badanych. Sprzęt mający kontakt z badanymi pożywkami może być wykonany ze stali nierdzewnej, plastiku lub szkła. Naczynia do badania należy odpowiednio nakrywać, aby zapobiec uciekaniu organizmów, jednocześnie zapewniając im wystarczający dopływ powietrza. W przypadku substancji chemicznych o wysokich współczynnikach adsorpcji, takich jak syntetyczne pyretroidy, konieczne może być zastosowanie szkła silanizowanego. W takich sytuacjach sprzęt po użyciu należy wyrzucić (49). Jednostki badane znakowane izotopowo oraz substancje lotne należy zabezpieczyć przed uchodzeniem. Należy zastosować pułapki (np. szklane płuczki gazowe) zawierające odpowiednie absorbenty zatrzymujące wszelkie pozostałości odparowujące z naczyń do badania.

Gleba

20. Badana gleba powinna być takiej jakości, która pozwoli na przeżycie oraz optymalnie także rozmnażanie organizmów badanych w okresie aklimatyzacji i badanych okresów, przy czym takie organizmy nie powinny charakteryzować się nieprawidłowym wyglądem ani zachowaniem. Organizmy powinny zakopywać się w glebie.
21. Jako podłoże w badaniach zaleca się wykorzystanie sztucznej gleby opisanej w rozdziale C.8 niniejszego załącznika (48). Opis przygotowania sztucznej gleby do wykorzystania w badaniach bioakumulacji oraz zalecenia dotyczące przechowywania sztucznej gleby podano w dodatku 4. Wysuszoną powietrzem sztuczną glebę można przechowywać do czasu jej wykorzystania w temperaturze pokojowej.
22. Naturalne gleby z niezanieczyszczonych miejsc mogą jednak również posłużyć jako gleba badana lub jako gleba do hodowli. Gleby naturalne należy scharakteryzować, podając co najmniej ich pochodzenie (miejsce zebrania), pH, zawartość węgla organicznego, rozkład wielkości cząstek (procent piasku, iltu i gliny), maksymalną zdolność zatrzymywania wody oraz procentową zawartość wilgoci (3). Użytecznych informacji powinna dostarczyć także analiza gleby lub jej składników pod kątem mikrozanieczyszczeń, przeprowadzona przed zastosowaniem takiej gleby. Jeśli wykorzystuje się glebę z użytków rolnych, taka gleba nie powinna być wcześniej poddawana działaniu środków ochrony roślin ani obornika od zwierząt poddanych działaniu takich substancji, przez co najmniej jeden rok w przypadku nawozów, a w przypadku nawozów organicznych – przez co najmniej sześć miesięcy przed pobraniem próbek (50). Procedury manipulacji dotyczące gleb naturalnych przed ich zastosowaniem w badaniach ekotoksykologicznych przeprowadzanych z wykorzystaniem skąposzczetów opisano w (3). W przypadku gleb naturalnych okres ich przechowywania w laboratorium powinien być możliwie jak najkrótszy.

Zastosowanie badanej substancji chemicznej

23. Badaną substancję chemiczną wprowadza się do gleby. Pod uwagę należy wziąć fizykochemiczne właściwości badanej substancji chemicznej. Badaną substancję chemiczną rozpuszczalną w wodzie należy przed jej zmieszaniem z glebą całkowicie rozpuścić w wodzie. Zalecana procedura wzbogacania dla badanych substancji chemicznych słabo rozpuszczalnych w wodzie obejmuje powleczenie badaną substancją chemiczną jednego lub większej liczby składników (sztucznej) gleby. Na przykład piasek kwarcowy, lub jego część, można namoczyć w roztworze badanej substancji chemicznej i odpowiedniego rozpuszczalnika organicznego, który

następnie powoli odparuje do sucha. Taką powleczoną frakcję można następnie wymieszać z mokrą glebą. Największą zaletą tej procedury jest to, że do gleby nie wprowadza się rozpuszczalnika. W przypadku zastosowania gleby naturalnej badaną substancję chemiczną można dodać poprzez wzbogacenie wysuszonej powietrzem części gleby, zgodnie z opisem dotyczącym sztucznej gleby powyżej, lub poprzez wzmieszanie badanej substancji chemicznej do mokrej gleby, przeprowadzając następnie etap odparowania, jeśli zastosowano środek rozpuszczający. Zasadniczo w miarę możliwości należy unikać kontaktu mokrej gleby z rozpuszczalnikami. Należy wziąć pod uwagę następujące kwestie (3):

- Jeśli zastosowano rozpuszczalnik inny niż woda, powinien to być rozpuszczalnik, który można wymieszać z wodą lub odprowadzić (na przykład odparować), pozostawiając na glebie wyłącznie badaną substancję chemiczną.
 - Jeśli stosuje się kontrolę rozpuszczalnika, nie ma potrzeby kontroli ujemnej. W kontroli rozpuszczalnika należy zastosować najwyższe stężenie rozpuszczalnika dodane do gleby oraz rozpuszczalnik z tej samej partii, którą wykorzystano do wykonania roztworu podstawowego. Toksyczność i lotność rozpuszczalnika oraz rozpuszczalność badanej substancji chemicznej w wybranym rozpuszczalniku powinny być głównymi kryteriami brany pod uwagę przy wyborze odpowiedniego środka rozpuszczającego.
24. W przypadku substancji chemicznych, które są słabo rozpuszczalne w wodzie oraz w rozpuszczalnikach organicznych, z daną ilością badanej substancji chemicznej można wymieszać drobno zmielony piasek kwarcowy, w ilości 2,0-2,5 g na jedno naczynie do badania, np. używając moździerza i tłuczka, w celu otrzymania pożądanego badanego stężenia. Taką mieszaninę piasku kwarcowego i badanej substancji chemicznej dodaje się do uprzednio zwilżonej gleby i dokładnie miesza z odpowiednią ilością dejonizowanej wody w celu otrzymania wymaganej zawartości wilgoci. Otrzymaną mieszaninę przekłada się do naczyń do badania. Procedurę tę powtarza się dla każdego badanego stężenia, a także przygotowuje się odpowiednią kontrolę z wykorzystaniem drobno zmielonego piasku kwarcowego, w ilości 2,0-2,5 g na jedno naczynie do badania.
25. Stężenie badanej substancji chemicznej w glebie należy określić po wzbogacaniu. Jednolite rozprowadzenie badanej substancji chemicznej w glebie należy zweryfikować przed wprowadzeniem badanych organizmów. Metodę zastosowaną do wzbogacania oraz uzasadnienie wyboru określonej procedury wzbogacania, należy przedstawić w sprawozdaniu (24).
26. Równowagę między glebą a wodą porową należy najlepiej uzyskać przed dodaniem organizmów; zaleca się okres czasu wynoszący cztery dni przy temperaturze 20 °C. W przypadku wielu organicznych substancji słabo rozpuszczalnych w wodzie czas wymagany do osiągnięcia prawdziwej równowagi między frakcją, która uległa adsorpcji a frakcją, która uległa rozpuszczeniu, liczy się w dniach lub miesiącach. W zależności od celu badania, na przykład, jeśli dąży się do odtworzenia warunków środowiskowych, wzbogacona gleba może być »postarzana« przez dłuższy okres, np. w przypadku metali może on wynosić trzy tygodnie przy temperaturze 20 °C (22).

Hodowla badanych organizmów

27. Organizmy należy przetrzymywać w stałej kulturze laboratoryjnej. Wytyczne na temat metod dotyczących kultur laboratoryjnych dla gatunków *Eisenia fetida* i *Eisenia andrei* oraz gatunków z rodziny wazonkowcowatych przedstawiono w dodatku 5 (zob. również (48) (51) (52)).
28. Organizmy wykorzystane w badaniach nie powinny wykazywać dających się zaobserwować oznak chorób, anomalii ani pasożytów.

PRZEPROWADZENIE BADANIA

29. Podczas etapu absorpcji organizmy są narażone na działanie badanej substancji chemicznej. Etap absorpcji powinien trwać 14 dni (w przypadku wazonkowcowatych) lub 21 dni (w przypadku dżdżownic), chyba że wykazano, iż osiągnięto stan ustalony.
30. Na potrzeby etapu eliminacji organizmy przenosi się do gleby niezawierającej badanej substancji chemicznej. Pierwszą próbkę należy pobrać po 4-24 godzinach po rozpoczęciu etapu eliminacji. Przykłady harmonogramów pobierania próbek, dla etapu absorpcji trwającego 21 dni i etapu eliminacji trwającego 21 dni, przedstawiono w dodatku 3.

Organizmy badane

31. W przypadku wielu gatunków lądowych z rodziny wazonkowcowatych masa poszczególnych osobników jest bardzo niska (np. 5-10 mg masy mokrej na jednego osobnika w przypadku *Enchytraeus albidus* oraz jeszcze mniej w przypadku *Enchytraeus crypticus* lub *Enchytraeus luxuriosus*); w celu przeprowadzenia pomiarów masy i analizy chemicznej konieczne może być łączne ważenie organizmów z naczyń do badania stanowiących replikaty (tj. wszystkie organizmy z naczynia stanowiącego replikat zostaną wykorzystane do uzyskania jednego wyniku analizy tkanki). Do każdego replikatu dodaje się 20 osobników z rodziny wazonkowcowatych; należy wykorzystywać co najmniej trzy replikaty. Jeśli analityczna granica wykrywalności badanej substancji chemicznej jest wysoka, konieczne może być wykorzystanie większej liczby organizmów. W przypadku gatunków badanych o większej masie poszczególnych osobników (*Eisenia fetida* i *Eisenia andrei*) można wykorzystać naczynia stanowiące replikaty zawierające jednego osobnika.
32. Dżdżownice wykorzystane w badaniu powinny mieć podobną masę (np. osobniki z gatunku *Eisenia fetida* i *Eisenia andrei* powinny mieć masę 250-600 mg na jednego osobnika). Wazonkowcowate (np. *Enchytraeus albidus*) powinny mieć długość około 1 cm. Wszystkie organizmy wykorzystane w konkretnym badaniu powinny pochodzić z tego samego źródła, a także powinny być dorosłymi zwierzętami z klitellum (zob.

dodatek 5). Jako że masa i wiek zwierzęcia mogą mieć wpływ na wartości współczynnika bioakumulacji (np. z powodu różnej zawartości lipidów lub obecności jaj), takie parametry należy dokładnie odnotować i wziąć pod uwagę podczas interpretacji wyników. Ponadto w trakcie etapu narażenia może dojść do złożenia kokonów, co również będzie miało wpływ na wartości współczynnika bioakumulacji. Zaleca się zważenie podpróbki organizmów badanych przed rozpoczęciem badania w celu oszacowania ich średniej masy suchej i mokrej.

33. Należy zastosować wysoki stosunek gleby do organizmów w celu zminimalizowania spadku stężenia badanej substancji chemicznej w glebie podczas etapu absorpcji. W przypadku gatunków *Eisenia fetida* i *Eisenia andrei* zaleca się minimalną ilość wynoszącą 50 g suchej masy gleby na jeden organizm, a w przypadku wazonkowcowatych – co najmniej 10-20 g suchej masy gleby na jedno naczynie do badania. Naczynia powinny zawierać warstwę gleby głębokości 2-3 cm (w przypadku wazonkowcowatych) lub 4-5 cm (w przypadku dżdżownic).
34. Organizmy zastosowane w badaniu usuwa się z hodowli (np. wazonkowcowate za pomocą pęsety jubilerskiej). Dorosłe zwierzęta przenosi się do badanej gleby niepoddanej działaniu badanej substancji chemicznej w celu ich aklimatyzacji, oraz karmi (zob. pkt 36). Jeśli warunki badania różnią się od warunków hodowli, do przystosowania organizmów do warunków badania powinien wystarczyć etap aklimatyzacji trwający 24-72 godziny. Po aklimatyzacji dżdżownice opłukuje się w szklanych naczyniach (np. szalkach Petriego) z czystą wodą, a następnie waży przed wprowadzeniem ich do gleby badanej. Przed ważeniem nadmiar wody należy usunąć z dżdżownic poprzez delikatne otarcie ich o krawędź naczynia lub poprzez ich ostrożne osuszenie za pomocą lekko zwilżonego ręcznika papierowego.
35. Zachowania badanych organizmów związane z zakopywaniem się w glebie należy obserwować i odnotowywać. W badaniach z wykorzystaniem dżdżownic zwierzęta (kontrolne i poddawane działaniu substancji) zazwyczaj zakopują się w glebie w ciągu okresu trwającego kilka godzin. Należy to sprawdzić nie później niż 24 godziny po wprowadzeniu organizmów do naczyń do badania. Jeśli dżdżownice nie zakopują się w glebie (np. ponad 10 % organizmów przez ponad połowę etapu absorpcji), oznacza to, że warunki badania nie są odpowiednie lub badane organizmy nie są zdrowe. W takim przypadku badanie należy przerwać i powtórzyć. Wazonkowcowate żyją w większości przypadków w porach w glebie oraz ich integument często może jedynie częściowo pozostawać w kontakcie z otaczającym ich podłożem. Zakłada się, że narażenie wazonkowcowatych zakopujących się w glebie i niezakopujących się jest równoważne, a więc w przypadku wazonkowcowatych niezakopujących się powtórzenie badania nie jest konieczne.

Karmienie

36. Należy zaplanować karmienie, jeśli stosuje się glebę z niską całkowitą zawartością węgla organicznego. Jeśli zastosowano glebę sztuczną, zaleca się tygodniową porcję pożywienia (tj. organizmy należy karmić raz na tydzień) wynoszącą 7 mg wysuszonego obornika na g masy suchej gleby w przypadku dżdżownic, oraz tygodniową porcję wynoszącą 2-2,5 mg zmielonych płatków owsianych na g masy suchej gleby w przypadku wazonkowcowatych (11). Pierwszą porcję pożywienia należy wymieszać z glebą bezpośrednio przed dodaniem badanych organizmów. Zaleca się stosowanie tego samego rodzaju pożywienia co w przypadku hodowli (zob. dodatek 5).

Światło i temperatura

37. Badania należy przeprowadzać w warunkach kontrolowanego cyklu światło/ciemność 16/8 godzin, z zalecanym natężeniem światła na obszarze z naczyniami do badania na poziomie 400-800 luksów (3). Temperatura przeprowadzania badania powinna wynosić 20 ± 2 °C przez cały czas trwania badania.

Badane stężenia

38. Stosuje się jedno stężenie. Sytuacje, w których wymagane jest dodatkowe stężenie lub stężenia, należy uzasadnić. Jeśli toksyczność (EC_x) badanej substancji chemicznej jest zbliżona do analitycznej granicy wykrywalności, zaleca się stosowanie badanej substancji chemicznej znakowanej izotopowo z wysokim poziomem promieniotwórczości właściwej. W przypadku metali stężenie powinno być wyższe niż poziom naturalnego tła w tkankach i glebie.

Replikaty

39. Minimalna liczba naczyń stanowiących replikaty poddanych działaniu substancji na potrzeby pomiarów kinetycznych (etap absorpcji i eliminacji) powinna wynosić trzy na jeden punkt pobierania próbek. Całkowita liczba przygotowanych replikatów powinna być wystarczająca, by objąć wszystkie pobrania próbek podczas etapu absorpcji i eliminacji.
40. Na potrzeby obserwacji biologicznych i pomiarów (np. stosunek masy suchej do masy mokrej, zawartość lipidów) oraz na potrzeby analizy stężeń tła w organizmach i glebie, należy zapewnić co najmniej 12 naczyń stanowiących replikaty kontroli ujemnej (cztery pobrane na początku i cztery na koniec etapu absorpcji, oraz cztery pobrane na koniec etapu eliminacji), jeśli nie zastosowano rozpuszczalnika innego niż woda. Jeśli do zastosowania badanej substancji chemicznej wykorzystano środek rozpuszczający, oprócz replikatów poddanych działaniu substancji należy zapewnić kontrolę rozpuszczalnika obejmującą wszystkie składniki prócz jednostki badanej (na początku etapu absorpcji należy pobrać próbki z czterech naczyń stanowiących replikaty oraz cztery próbki na koniec etapu absorpcji i cztery na koniec etapu eliminacji). W takim przypadku można zapewnić także cztery dodatkowe naczynia stanowiące replikaty kontroli ujemnej (bez rozpuszczalnika) na potrzeby opcjonalnego pobierania próbek na koniec etapu absorpcji. Takie replikaty można porównać pod kątem parametrów biologicznych z kontrolą rozpuszczalnika w celu uzyskania informacji na temat możliwego wpływu rozpuszczalnika na organizmy badane. Zaleca się zapewnienie wystarczającej liczby dodatkowych rezerwowych naczyń stanowiących replikaty (np. ośmiu) na potrzeby poddawania działaniu substancji i kontroli.

Częstotliwość pomiarów jakości gleby

41. pH gleby, zawartość wilgoci w glebie oraz jej temperaturę (stałą) w pomieszczeniu badawczym należy mierzyć na początku i na końcu etapu absorpcji i etapu eliminacji. Raz na tydzień należy skontrolować zawartość wilgoci w glebie poprzez zważenie naczyń do badania oraz porównanie faktycznych mas z początkowymi masami na początku badania. Straty wody należy uzupełniać poprzez dodanie dejonizowanej wody.

Pobieranie próbek oraz analiza organizmów i gleby

42. Przykładowy harmonogram etapów absorpcji i eliminacji w badaniach bioakumulacji z wykorzystaniem dżdżownic i wazonkowcowatych przedstawiono w dodatku 3.
43. Próbkę gleby pobiera się z naczyń do badania w celu określenia stężenia badanej substancji chemicznej przed dodaniem organizmów, a także podczas etapu absorpcji i etapu eliminacji. Podczas badania określa się stężenia badanej substancji chemicznej w organizmach i glebie. Zasadniczo mierzy się całkowite stężenia w glebie. Opcjonalnie można dokonać pomiaru stężeń w wodzie porowej. W takim przypadku należy przed rozpoczęciem badania przedstawić uzasadnienie i odpowiednie metody oraz takie informacje należy uwzględnić także w sprawozdaniu.
44. Próbkę organizmów i gleby pobiera się co najmniej sześć razy podczas etapu absorpcji i eliminacji. Jeśli wykazano stabilność badanej substancji chemicznej, liczbę analiz gleby można zmniejszyć. Zaleca się analizowanie co najmniej trzech replikatów na początku i na końcu etapu absorpcji. Jeśli stężenie w glebie mierzone na końcu etapu absorpcji różni się od stężenia początkowego o ponad 30 %, próbki gleby pobrane w innych datach należy również poddać analizie.
45. Za każdym razem przy pobieraniu próbek należy usunąć z gleby organizmy znajdujące się w danym replikacie (np. przez wyłożenie gleby z replikatu na płytką tackę i wyjęcie organizmów za pomocą miękkiej pęsety jubilerskiej), a następnie opłukać je szybko w wodzie na płytce szklanej lub metalowej tace. Należy usunąć nadmiar wody (zob. pkt 34). Następnie należy ostrożnie przenieść organizmy do zważonego uprzednio naczynia i od razu je zważyć, wraz z zawartością układu pokarmowego.
46. Dżdżownicom (*Eisenia* sp.) należy umożliwić wypróżnienie się przez noc, np. na wilgotnej bibule filtracyjnej na przykrytych szalkach Petriego (zob. pkt 34). Gdy dżdżownice się wypróżnią, należy określić masę organizmów w celu dokonania oceny ewentualnego spadku biomasy podczas badania (zob. kryteria ważności opisane w pkt 17). Ważenie i analizę tkanek wazonkowcowatych przeprowadza się bez etapu wypróżniania, jako że jest to technicznie trudne z uwagi na mały rozmiar tych organizmów. Po końcowym określeniu masy organizmy należy niezwłocznie uśmiercić, za pomocą najbardziej odpowiedniej metody (np. używając ciekłego azotu lub zamrażając je w temperaturze poniżej $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$).
47. Podczas etapu eliminacji organizmy wymieniają zanieczyszczoną zawartość układu pokarmowego na czystą glebę. Oznacza to, że pomiary próbek pobranych z organizmów bez wypróżnienia (w tym przypadku wazonkowcowatych) bezpośrednio przed etapem eliminacji zawierają zanieczyszczoną glebę z układu pokarmowego. W przypadku skąposzczetów wodnych zakłada się, że większość zanieczyszczonej zawartości układu pokarmowego zostaje zastąpiona czystym osadem po początkowym okresie etapu eliminacji trwającym 4–24 godziny, np. (46). Podobne ustalenia odnotowano w przypadku dżdżownic w badaniach dotyczących akumulacji znakowanego izotopowo kadmu i cynku (78). W przypadku wazonkowcowatych bez wypróżnienia jako stężenie w tkance po wypróżnieniu można przyjąć stężenie pierwszej próbki pobranej podczas etapu eliminacji. Aby uwzględnić rozcieńczenie stężenia jednostki badanej przez niezanieczyszczoną glebę podczas etapu eliminacji, masę zawartości układu pokarmowego można oszacować na podstawie stosunku masy mokrej organizmu/masy popiołu z organizmu lub masy suchej organizmów/masy popiołu z organizmu.
48. Próbkę gleby i organizmów należy poddać analizie niezwłocznie po usunięciu organizmów (tj. w ciągu 1-2 dni), aby zapobiec rozkładowi lub innym stratom, a także zaleca się obliczenie przybliżonej szybkości absorpcji i eliminacji w trakcie trwania badania. Jeśli analizę wykonuje się z opóźnieniem, próbki należy przechowywać z zastosowaniem odpowiedniej metody, np. głębokiego zamrażania ($\leq -18\text{ }^{\circ}\text{C}$).
49. Należy sprawdzić, czy dokładność i odtwarzalność analizy chemicznej, a także odzysk badanej substancji chemicznej z próbek gleby i organizmów są zadowalające dla danej metody. Należy odnotować efektywność ekstrakcji, granicę wykrywalności oraz granicę oznaczalności. Należy także sprawdzić, czy badana substancja chemiczna nie jest wykrywalna w naczyniach kontrolnych w stężeniach wyższych niż tło. Jeśli stężenie badanej substancji chemicznej w organizmie badanym Ca wynosi >0 w organizmach kontrolnych, należy to uwzględnić przy obliczaniu parametrów kinetycznych (zob. dodatek 2). Przez cały okres trwania badania wszystkimi próbkami należy posługiwać się w taki sposób, by zminimalizować ich zanieczyszczenie i straty (np. wynikające z adsorpcji badanej substancji chemicznej na przyrządzie do pobierania próbek).

50. W przypadku zastosowania badanych substancji chemicznych znakowanych izotopowo możliwe jest przeprowadzenie analizy macierzystej substancji chemicznej i metabolitów. Określenie ilościowe macierzystej badanej substancji chemicznej i metabolitów w stanie ustalonym lub na koniec etapu absorpcji dostarcza ważnych informacji. Próbkę powinny wtedy być »oczyszczone«, aby macierzysta badana substancja chemiczna mogła zostać osobno określona ilościowo. Jeśli poszczególne metabolity przekraczają 10 % całkowitej promieniotwórczości w analizowanej próbce lub próbkach, zaleca się określenie takich metabolitów.
51. Odzysk całkowity, oraz odzysk badanej substancji chemicznej w organizmach, glebie a także, jeśli zastosowano, w pułapkach zawierających absorbenty umożliwiające zatrzymanie odparowującej badanej substancji chemicznej, należy odnotować i przedstawić w sprawozdaniu.
52. Łączne traktowanie osobników pochodzących z konkretnego naczynia do badania jest dopuszczalne w przypadku organizmów z rodziny wazonkowcowatych, które są mniejsze niż dżdżownice. Jeśli takie łączenie obejmuje zmniejszenie liczby replikatów, ogranicza to statystyczne procedury, jakie można zastosować do danych. Jeśli wymagana jest konkretna procedura i moc statystyczna, należy w badaniu zastosować odpowiednią liczbę naczyń do badania stanowiących replikaty, w celu uwzględnienia pożądanego łączenia, procedury i mocy.
53. Zaleca się, by współczynnik bioakumulacji był wyrażony zarówno jako funkcja całkowitej masy suchej oraz, w razie konieczności (np. w przypadku wysoce hydrofobowych substancji chemicznych), jako funkcja zawartości lipidów. Do określenia zawartości lipidów należy zastosować odpowiednie metody (w tym celu należy dostosować istniejące metody, np. (31) (58)). W ramach takich metod stosuje się technikę ekstrakcji z wykorzystaniem chloroformu/metanolu. W celu uniknięcia jednak rozpuszczalników chlorowanych należy zastosować zmodyfikowaną metodę Bligha i Dyera (9) zgodnie z opisem w (17). Jako że w wyniku zastosowania różnych metod można uzyskać różniące się wartości, ważne jest podanie szczegółowych informacji na temat zastosowanej metody. Jeśli jest to możliwe, tj. jeśli jest dostępna wystarczająca ilość tkanki organizmów, analizę lipidów należy przeprowadzić z użyciem tej samej próbki lub ekstraktu, których użyto do analizy badanej substancji chemicznej, jako że lipidy często muszą zostać usunięte z ekstraktu przed analizą za pomocą chromatografii (49). Do pomiaru zawartości lipidów można również wykorzystać zwierzęta kontrolne, a wartości dotyczące zawartości lipidów mogą następnie zostać wykorzystane do normalizowania wartości współczynnika bioakumulacji. Przy zastosowaniu tego drugiego podejścia ogranicza się zanieczyszczenie przyrządów badaną substancją chemiczną.

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Opracowanie wyników

54. Krzywą absorpcji badanej substancji chemicznej uzyskuje się poprzez wykreślenie jej stężenia w/na organizmach podczas etapu absorpcji w czasie w skali arytmetycznej. Kiedy krzywa osiągnie plateau lub stan ustalony (zob. definicje w dodatku 1), współczynnik bioakumulacji w stanie ustalonym oblicza się na podstawie:

$$\frac{C_a \text{ w stanie ustalonym lub na końcu etapu absorpcji (średnia)}}{C_s \text{ w stanie ustalonym lub na końcu etapu absorpcji (średnia)}}$$

C_a stanowi stężenie badanej substancji chemicznej w organizmie badanym.

C_s stanowi stężenie badanej substancji chemicznej w glebie.

55. W przypadku nieosiągnięcia stanu ustalonego kinetyczny współczynnik akumulacji (BAFK), oparty na stałych szybkości, należy określić na podstawie współczynnika bioakumulacji w stanie równowagi zgodnie z poniższym opisem:

— należy określić współczynnik akumulacji (BAF_k) jako stosunek k_s/k_e ,

— szybkość absorpcji i eliminacji najlepiej obliczyć jednocześnie (zob. równanie 11 w dodatku 2),

— stałą szybkości eliminacji (k_e) określa się zazwyczaj na podstawie krzywej eliminacji (tj. wykresu stężenia jednostki badanej w organizmach podczas etapu eliminacji). Stałą szybkości absorpcji k_s oblicza się następnie na podstawie takiego k_e oraz wartości C_a , którą uzyskuje się z krzywej absorpcji – zob. opis tych metod w dodatku 2. Preferowaną metodą uzyskania kinetycznego współczynnika akumulacji oraz stałych szybkości, k_s i k_e jest zastosowanie nieliniowych komputerowych metod estymacji parametrycznej. Jeśli w sposób ewidentny eliminacja nie jest procesem pierwszego rzędu, należy zastosować bardziej złożone modele.

Sprawozdanie z badania

56. Sprawozdanie z badania powinno zawierać następujące informacje:

Badana substancja chemiczna

- wszelkie dostępne informacje na temat toksyczności ostrej lub przewlekłej (np. EC₅₀, LC₅₀, NOEC) badanej substancji chemicznej w odniesieniu do żyjących w glebie skąposzczetów,
- czystość, cechy fizyczne i właściwości fizykochemiczne, np. współczynnik podziału oktanol/woda, rozpuszczalność w wodzie,
- dane identyfikacyjne substancji chemicznej; źródło jednostki badanej, nazwę i stężenie wszelkich zastosowanych rozpuszczalników,
- w przypadku zastosowania badanej substancji chemicznej znakowanej izotopowo, dokładne położenie znakowanych atomów, promieniotwórczość właściwą oraz czystość radiochemiczną.

Badane gatunki

- nazwę naukową, szczep, źródło, wszelkie przypadki wcześniejszego poddania działaniu, aklimatyzację, wiek, rozmiar-zakres itp.

Warunki badania

- zastosowaną procedurę badania,
- rodzaj i charakterystykę zastosowanego oświetlenia i jego cykl lub cykle,
- projekt badania (np. liczbę i rozmiar naczyń do badania, masę gleby i wysokość warstwy gleby, liczbę replikatów, liczbę organizmów w każdym replikacie, liczbę badanych stężeń, czas trwania etapu absorpcji i eliminacji, częstotliwość pobierania próbek),
- uzasadnienie wyboru materiału, z którego wykonano naczynia do badania,
- metodę przygotowania i zastosowania jednostki badanej, a także uzasadnienie wyboru konkretnej metody,
- badane stężenia nominalne, średnie mierzonych wartości oraz ich odchylenia standardowe w naczyniach do badania, a także metodę uzyskania takich wartości,
- źródło składników gleby sztucznej lub – w przypadku zastosowania gleb naturalnych – pochodzenie gleby, opis wszelkich wcześniejszych procesów, jakim została poddana, wyniki kontroli (przeżycie, rozwój biomasy, rozmnażanie), charakterystykę gleby (pH, całkowitą zawartość węgla organicznego, rozkład wielkości cząstek (procent piasku, łu i gliny), maksymalną zdolność zatrzymywania wody, procentową zawartość wilgoci na początku i na końcu badania, oraz wszelkie inne dokonane pomiary),
- szczegółowe informacje na temat traktowania próbek gleby i organizmów, w tym szczegółowe informacje na temat procedur przygotowania, przechowywania, wzbogacania, ekstrakcji oraz procedur analitycznych (oraz precyzji) zastosowanych w odniesieniu do jednostki badanej w organizmach i glebie, oraz zawartość lipidów (jeśli zmierzono), a także odzysk jednostki badanej.

Wyniki

- śmiertelność organizmów kontrolnych i organizmów w każdym naczyniu do badania oraz wszelkie zaobserwowane niestandardowe zachowania (np. unikanie gleby, nierozmnażanie się w badaniu bioakumulacji z wykorzystaniem wazonkowcowatych),
- stosunek masy suchej do masy mokrej gleby i organizmów badanych (przydatne do normalizacji),
- masy mokre organizmów przy każdym pobieraniu próbek; w przypadku dżdżownic masy mokre na początku badania oraz przy każdym pobieraniu próbek, przed wypróżnieniem się i po wypróżnieniu się organizmów,
- zawartość lipidów w organizmach badanych (jeśli ustalono),

- krzywe, pokazujące kinetykę absorpcji i eliminacji badanej substancji chemicznej w organizmach, oraz okres czasu konieczny do osiągnięcia stanu ustalonego,
- C_a i C_s (wraz z odchyleniem standardowym i zakresem, w stosownych przypadkach) dla wszystkich przypadków pobierania próbek (C_a wyrażone jako $g\ kg^{-1}$ mokrej i suchej masy całego ciała, a C_s wyrażone jako $g\ kg^{-1}$ mokrej i suchej masy gleby). Jeśli wymagany jest współczynnik akumulacji biota-gleba (np. na potrzeby porównania wyników z dwóch lub większej liczby badań przeprowadzonych z wykorzystaniem zwierząt o różnej zawartości lipidów), C_a można dodatkowo wyrazić jako $g\ kg^{-1}$ zawartości lipidów organizmu, a C_s jako $g\ kg^{-1}$ węgla organicznego w glebie,
- współczynnik bioakumulacji (wyrażony jako $kg\ gleby\ kg^{-1}$ organizmu), stałą szybkości absorpcji gleby k_s (wyrażoną jako $g\ gleby\ kg^{-1}$ organizmu $dzień^{-1}$), stałą szybkości eliminacji k_e (wyrażoną w $dzień^{-1}$); współczynnik akumulacji biota-gleba (wyrażony jako $kg\ węgla\ organicznego\ w\ glebie\ kg^{-1}$ zawartość lipidów w organizmach) należy również przedstawić w sprawozdaniu,
- jeśli zmierzono: procent macierzystej substancji chemicznej, metabolitów oraz związanych substancji resztkowych (tj. procent badanej substancji chemicznej, która nie może zostać poddana ekstrakcji za pomocą powszechnych metod ekstrakcji) wykryte w glebie i zwierzętach badanych,
- metody statystyczne zastosowane do analizy danych.

Ocena wyników

- zgodność wyników z kryteriami ważności wymienionymi w pkt 17,
- nieoczekiwane lub niestandardowe wyniki, np. niepełna eliminacja badanej substancji chemicznej ze zwierząt badanych.

BIBLIOGRAFIA:

- (1) Amorim M (2000). Chronic and toxicokinetic behavior of Lindane (γ -HCH) in the Enchytraeid *Enchytraeus albidus*. Praca magisterska, Uniwersytet w Coimbrze.
- (2) ASTM (2000). Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates. Amerykańskie Stowarzyszenie Badań i Materiałów (ASTM), E 1688-00a.
- (3) ASTM International (2004). Standard guide for conducting laboratory soil toxicity or bioaccumulation tests with the Lumbricid earthworm *Eisenia fetida* and the Enchytraeid potworm *Enchytraeus albidus*. ASTM International, E1676-04: 26 s.
- (4) Beek B, Boehling S, Bruckmann U, Franke C, Joehncke U, Studinger G (2000). The assessment of bioaccumulation. W: Hutzinger, O. (red.), The Handbook of Environmental Chemistry, t. 2 część J (t. red.: B. Beek): Bioaccumulation - New Aspects and Developments. Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 235–276.
- (5) Belfroid A, Sikkenk M, Seinen W, Van Gestel C, Hermens J (1994). The toxicokinetic behavior of chlorobenzenes in earthworms (*Eisenia andrei*): Experiments in soil. Environ. Toxicol. Chem. 13: 93–99.
- (6) Belfroid A, Van Wezel A, Sikkenk M, Van Gestel C, Seinen W & Hermens J (1993). The toxicokinetic behavior of chlorobenzenes in earthworms (*Eisenia andrei*): Experiments in water. Ecotox. Environ. Safety 25: 154–165.
- (7) Belfroid A, Meiling J, Drenth H, Hermens J, Seinen W, Van Gestel C (1995). Dietary uptake of superlipophilic compounds by earthworms (*Eisenia andrei*). Ecotox. Environ. Safety 31: 185–191.
- (8) Bell AW (1958). The anatomy of *Enchytraeus albidus*, with a key to the species of the genus *Enchytraeus*. Ann. Mus. Novitat. 1902: 1–13.
- (9) Bligh EG i Dyer WJ (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Pysiol. 37: 911–917.
- (10) Bouche M (1972). Lombriciens de France. Ecologie et Systematique. INRA, Annales de Zoologie-Ecologie animale, Paris, 671 s.

- (11) Bruns E, Egeler Ph, Moser T, Römbke J, Scheffczyk A, Spörlein P (2001a). Standardisierung und Validierung eines Bioakkumulationstests mit terrestrischen Oligochaeten. Report to the German Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), R&D nr: 298 64 416.
- (12) Bruns E, Egeler Ph, Römbke J, Scheffczyk A, Spörlein P (2001b). Bioaccumulation of lindane and hexachlorobenzene by the oligochaetes *Enchytraeus luxuriosus* and *Enchytraeus albidus* (Enchytraeidae, Oligochaeta, Annelida). *Hydrobiologia* 463: 185–196.
- (13) Conder JM i Lanno RP (2003). Lethal critical body residues as measures of Cd, Pb, and Zn bioavailability and toxicity in the earthworm *Eisenia fetida*. *J. Soils Sediments* 3: 13–20.
- (14) Connell DW i Markwell RD (1990). Bioaccumulation in the Soil to Earthworm System. *Chemosphere* 20: 91–100.
- (15) Didden WAM (1993). Ecology of Terrestrial Enchytraeidae. *Pedobiologia* 37: 2–29.
- (16) Didden W (2003). Oligochaeta, w: Bioindicators and biomonitors. Markert, B.A., Breure, A.M. & Zechmeister, H.G. (red.). Elsevier Science Ltd., The Netherlands, s. 555–576.
- (17) De Boer J, Smedes F, Wells D, Allan A (1999). Report on the QUASH interlaboratory study on the determination of total-lipid in fish and shellfish. Round 1 SBT-2, Exercise 1000, EU, Standards, Measurement and Testing Programme.
- (18) Dietrich DR, Schmid P, Zweifel U, Schlatter C, Jenni-Eiermann S, Bachmann H, Bühler U, Zbinden N (1995). Mortality of birds of prey following field application of granular carbofuran: A Case Study. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 29: 140–145.
- (19) Rozporządzenie (WE) nr 1907/2006 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 18 grudnia 2006 r. w sprawie rejestracji, oceny, udzielania zezwoleń i stosowanych ograniczeń w zakresie chemikaliów (REACH), utworzenia Europejskiej Agencji Chemikaliów, zmieniające dyrektywę 1999/45/WE i rozporządzenie Rady (EWG) nr 793/93 i rozporządzenie Komisji (WE) nr 1488/94, jak również dyrektywę Rady 76/769/EWG i dyrektywę Komisji 91/155/EWG, 93/67/EWG, 93/105/WE i 2000/21/WE (Dz.U. L 396 z 30.12.2006, s. 1).
- (20) Edwards CA i Bohlen PJ (1996). *Biology and ecology of earthworms*. wydanie trzecie, Chapman & Hall, Londyn, 426 s.
- (21) OECD (2008), *Bioaccumulation in Sediment-dwelling Benthic Oligochates*, Test Guideline No. 315, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paryż.
- (22) Egeler Ph, Gilberg D, Scheffczyk A, Moser Th i Römbke J (2009). Validation of a Soil Bioaccumulation Test with Terrestrial Oligochaetes by an International Ring Test (Validierung einer Methode zur standardisierten Messung der Bioakkumulation mit terrestrischen Oligochaeten). Sprawozdanie dla federalnej agencji środowiskowej (Umweltbundesamt Dessau-Rosslau), R&D nr: 204 67 458: 149 s. Dostępne do pobrania pod adresem: <http://www.oecd.org/dataoecd/12/20/42552727.pdf>.
- (23) Elmegaard N i Jagers op Akkerhuis GAJM (2000). Safety factors in pesticide risk assessment, Differences in species sensitivity and acute-chronic relations. National Environmental Research Institute, NERI Technical Report 325: 57 s.
- (24) Environment Canada (1995). Guidance document on measurement of toxicity test precision using control sediments spiked with a reference toxicant. Environmental Protection Series Report EPS 1/RM/30.
- (25) Prokuratura Europejska (EPPO) (2003). Environmental Risk Assessment scheme for plant protection products. Soil organisms and functions, EPPO (European Plant Protection Organization) Standards, Bull, OEPP/EPPO 33: 195–208.
- (26) Franke C (1996). How meaningful is the bioconcentration factor for risk assessment? *Chemosphere* 32: 1897–1905.

- (27) Franke C, Studinger G, Berger G, Böhling S, Bruckmann U, Cohors-Fresenborg D, Jöhncke U (1994). The assessment of bioaccumulation. *Chemosphere* 29: 1501–1514.
- (28) Füll C (1996). Bioakkumulation und Metabolismus von -1,2,3,4,5,6-Hexachlorcyclohexan (Lindan) und 2-(2,4-Dichlorphenoxy)-propionsäure (Dichlorprop) beim Regenwurm *Lumbricus rubellus* (Oligochaeta, Lumbricidae). *Praca naukowa, Uniwersytet w Moguncji*, 156 s.
- (29) Füll C, Schulte C, Kula C (2003). Bewertung der Auswirkungen von Pflanzenschutzmitteln auf Regenwürmer. *UWSF – Z. Umweltchem, Ökotox.* 15: 78–84.
- (30) Gabric A.J, Connell DW, Bell PRF (1990). A kinetic model for bioconcentration of lipophilic compounds by oligochaetes. *Wat. Res.* 24: 1225–1231.
- (31) Gardner WS, Frez WA, Cichocki EA, Parrish CC (1985). Micromethods for lipids in aquatic invertebrates. *Limnology and Oceanography* 30: 1099–1105.
- (32) Hawker DW i Connell DW (1988). Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. *Wat. Res.* 22: 701–707.
- (33) Hund-Rinke K i Wiechering H (2000). Earthworm avoidance test for soil assessments: An alternative for acute and reproduction tests. *J. Soils Sediments* 1: 15–20.
- (34) Hund-Rinke K, Römbke J, Riepert F, Achazi R (2000). Beurteilung der Lebensraumfunktion von Böden mit Hilfe von Regenwurmtests. In: *Toxikologische Beurteilung von Böden*. Heiden, S., Erb, R., Dott, W. & Eisen-träger, A. (red.), Spektrum Verl., Heidelberg, 59–81.
- (35) ISO 11268-2 (1998) Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction.
- (36) Jaenike J (1982). »*Eisenia foetida*« is two biological species. *Megadrilogica* 4: 6–8.
- (37) Jager T (1998). Mechanistic approach for estimating bioconcentration of organic chemicals in earthworms (Oligochaeta). *Environ. Toxicol. Chem.* 17: 2080–2090.
- (38) Jager T, Sanchez PA, Muijs B, van der Welde E, Posthuma L (2000). Toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons in *Eisenia andrei* (Oligochaeta) using spiked soil. *Environ. Toxicol. Chem.* 19: 953–961.
- (39) Jager T, Baerselman R, Dijkman E, De Groot AC, Hogendoorn EA, DeJong A, Kruitbosch JAW, Peijnenburg W J G. M (2003a). Availability of polycyclic aromatic hydrocarbons to earthworms (*Eisenia andrei*, Oligochaeta) in field-polluted soils and soil-sediment mixtures. *Environ. Toxicol. Chem.* 22: 767–775.
- (40) Jager T, Fleuren RLJ, Hoogendoorn E, de Korte G (2003b). Elucidating the routes of exposure for organic chemicals in the earthworm, *Eisenia andrei* (Oligochaeta). *Environ. Sci. Technol.* 37: 3399–3404.
- (41) Janssen MPM, Bruins A, De Vries TH, Van Straalen NM (1991). Comparison of cadmium kinetics in four soil arthropod species. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 20: 305–312.
- (42) Kasprzak K (1982). Review of enchytraeid community structure and function in agricultural ecosystems. *Pedobiologia* 23: 217–232.
- (43) Khalil AM (1990). Aufnahme und Metabolismus von ¹⁴C-Hexachlorbenzol und ¹⁴C-Pentachlornitrobenzol in Regenwürmern. *Praca naukowa, uniwersytet w Monachium*, 137 s.
- (44) Landrum PF (1989). Bioavailability and toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed to sediments for the amphipod *Pontoporeia hoyi*. *Environ. Sci. Toxicol.* 23: 588–595.

- (45) Marinussen MPJC, Van der Zee SEATM, De Haan FA (1997). Cu accumulation in *Lumbricus rubellus* under laboratory conditions compared with accumulation under field conditions. *Ecotox. Environ. Safety* 36: 17–26.
- (46) Mount DR, Dawson TD, Burkhard LP (1999). Implications of gut purging for tissue residues determined in bioaccumulation testing of sediment with *Lumbriculus variegates*. *Environ. Toxicol. Chem.* 18: 1244–1249.
- (47) Nendza M (1991). QSARs of bioaccumulation: Validity assessment of log K_{ow} /log BCF correlations, w: R. Nagel and R. Loskill (red.): Bioaccumulation in aquatic systems, Contributions to the assessment, Proceedings of an international workshop, Berlin 1990, VCH, Weinheim.
- (48) Rozdział C.8 niniejszego załącznika. Toksyczność dla dżdżownic.
- (49) Rozdział C.13 niniejszego załącznika. Biokoncentracja: badanie ryb w warunkach przepływu.
- (50) Rozdział C.21 niniejszego załącznika. Mikroorganizmy żyjące w glebie: badanie przemian azotu.
- (51) OECD (2004a), Enchytraeid reproduction test, Test Guideline No. 220, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paryż.
- (52) Oecd (2004b), Earthworm reproduction test (*Eisenia fetida*/*Eisenia Andrei*), Test Guideline No. 222, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paryż.
- (53) OECD (2008), Bioaccumulation in Sediment-dwelling Benthic Oligochates, Test Guideline No. 315, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paryż.
- (54) .Petersen H i Luxton M (1982). A comparative analysis of soil fauna populations and their role in decomposition processes. *Oikos* 39: 287–388.
- (55) Phillips DJH (1993). Bioaccumulation. In: Handbook of Ecotoxicology Vol. 1. Calow P. (ed.). Blackwell Scientific Publ., Oxford. 378–396.
- (56) Pflugmacher J (1992). Struktur-Aktivitätsbestimmungen (QSAR) zwischen der Konzentration von Pflanzenschutzmitteln und dem Octanol-Wasser-Koeffizienten UWSF- Z. Umweltchem. Ökotox. 4: 77–81.
- (57) Posthuma L, Weltje L, Anton-Sanchez FA (1996). Joint toxic effects of cadmium and pyrene on reproduction and growth of the earthworm *Eisenia fetida*. RIVM Report No. 607506001, Bilthoven.
- (58) Randall RC, Lee II H, Ozretich RJ, Lake JL, Pruell RJ (1991). Evaluation of selected lipid methods for normalising pollutant bioaccumulation. *Environ.Toxicol. Chem.* 10: 1431–1436.
- (59) Römbke J, Egele, P, Füll C (1998). Literaturstudie über Bioakkumulationstests mit Oligochaeten im terrestrischen Medium. UBA-Texte 28/98, 84 s.
- (60) Römbke J and Moser Th (1999). Organisation and performance of an international ring-test for the validation of the Enchytraeid reproduction test. UBA-Texte 4/99: 373 s.
- (61) Römbke J, Riepert F, Achazi R (2000). Enchytraeen als Testorganismen, w: Toxikologische Beurteilung von Böden. Heiden, S., Erb, R., Dott, W. & Eisentraeger, A. (red.). Spektrum Verl., Heidelberg. 105–129.
- (62) Romijn CA.FM, Luttik R, Van De Meent D, Slooff W,Canton JH (1993). Presentation of a General Algorithm to Include Effect Assessment on Secondary Poisoning in the Derivation of Environmental Quality Criteria, Part 2: Terrestrial food chains. *Ecotox. Envir. Safety* 27: 107–127.

- (63) Sample BE, Suter DW, Beauchamp JJ, Efroymson RA (1999). Literature-derived bioaccumulation models for earthworms: Development and validation. *Environ. Toxicol. Chem.* 18: 2110–2120.
- (64) Schlosser H-J i Riepert F (1992). Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Bodenraubmilben (Gamasina), Teil 2: Erste Ergebnisse mit Lindan und Kaliumdichromat in subletaler Dosierung. *Zool. Beitr. NF* 34: 413–433.
- (65) Schmelz R i Collado R (1999). *Enchytraeus luxuriosus* sp. nov., a new terrestrial oligochaete species (Enchytraeidae, Clitellata, Annelida). *Carolinea* 57: 93–100.
- (66) Sims R W i Gerard BM (1985). Earthworms, w: Kermack, D. M. & Barnes, R. S. K. (Hrsg.): *Synopses of the British Fauna (New Series) No. 31.* 171 S. London: E. J. Brill/Dr W. Backhuys.
- (67) Sousa JP, Loureiro S, Pieper S, Frost M, Kratz W, Nogueira AJA, Soares AMVM (2000). Soil and plant diet exposure routes and toxicokinetics of lindane in a terrestrial isopod. *Environ. Toxicol. Chem.* 19: 2557–2563.
- (68) Spacie A i Hamelink JL (1982). Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 1, 309–320.
- (69) Stephenson GL, Kaushik A, Kaushik NK, Solomon KR, Steele T, Scroggins RP (1998). Use of an avoidance-response test to assess the toxicity of contaminated soils to earthworms. w: *Advances in earthworm ecotoxicology.* S. Sheppard, J. Bembridge, M. Holmstrup, L. Posthuma (red.). Setac Press, Pensacola, 67–81.
- (70) Sterenborg I, Vork NA, Verkade SK, Van Gestel CAM, Van Straalen NM (2003). Dietary zinc reduces uptake but not metallothionein binding and elimination of cadmium in the springtail *Orchesella cincta*. *Environ. Toxicol. Chemistry* 22: 1167–1171.
- (71) UBA (Umweltbundesamt) (1991). Bioakkumulation - Bewertungskonzept und Strategien im Gesetzesvollzug. UBA-Texte 42/91. Berlin.
- (72) US EPA (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Second Edition, EPA 600/R-99/064, US, Environmental Protection Agency, Duluth, MN, March 2000.
- (73) Van Brummelen TC i Van Straalen NM (1996). Uptake and elimination of benzo(a)pyrene in the terrestrial isopod *Porcellio scaber*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 31: 277–285.
- (74) Van Gestel CAM. (1992). The influence of soil characteristics on the toxicity of chemicals for earthworms: a review, w: *Ecotoxicology of Earthworms* (red. Becker, H, Edwards, PJ, Greig-Smith, PW & Heimbach, F). Intercept Press, Andover (GB).
- (75) Van Gestel CA i Ma W-C (1990). An approach to quantitative structure-activity relationships (QSARs) in earthworm toxicity studies. *Chemosphere* 21: 1023–1033.
- (76) Van Straalen NM, Donker MH, Vijver MG, van Gestel CAM (2005). Bioavailability of contaminants estimated from uptake rates into soil invertebrates. *Environmental Pollution* 136: 409–417.
- (77) Venter JM i Reinecke AJ (1988). The life-cycle of the compost-worm *Eisenia fetida* (Oligochaeta). *South African J. Zool.* 23: 161–165.
- (78) Vijver MG, Vink JPM, Jager T, Wolterbeek HT, van Straalen NM, van Gestel CAM (2005). Biphasic elimination and uptake kinetics of Zn and Cd in the earthworm *Lumbricus rubellus* exposed to contaminated floodplain soil. *Soil Biol, Biochem.* 37: 1843–1851.
- (79) Widianarko B i Van Straalen NM (1996). Toxicokinetics-based survival analysis in bioassays using nonpersistent chemicals, *Environ. Toxicol. Chem.* 15: 402–406.
-

Dodatek 1

DEFINICJE

Bioakumulacja to wzrost stężenia badanej substancji chemicznej w organizmie lub na organizmie w stosunku do stężenia badanej substancji chemicznej w otaczającym środowisku. Bioakumulacja wynika zarówno z procesu biokoncentracji, jak i z procesu biomagnifikacji (zob. poniżej).

Biokoncentracja to wzrost stężenia badanej substancji chemicznej w/na organizmie, wynikający z absorpcji substancji chemicznej wyłącznie z otaczającego środowiska (np. poprzez powierzchnię ciała oraz spożytą glebę), w stosunku do stężenia badanej substancji chemicznej w otaczającym środowisku.

Biomagnifikacja to wzrost stężenia badanej substancji chemicznej w/na organizmie, wynikający głównie ze absorpcji zanieczyszczonego pożywienia lub żeru, w stosunku do stężenia badanej substancji chemicznej w takim pożywieniu lub żerze. Biomagnifikacja może prowadzić do przeniesienia lub akumulacji jednostki badanej w ramach sieci pokarmowych.

Eliminacja badanej substancji chemicznej stanowi stratę takiej substancji chemicznej z tkanki badanego organizmu w drodze czynnych lub biernych procesów, przy czym taka strata zachodzi niezależnie od obecności lub braku jednostki badanej w otaczającym środowisku.

Współczynnik bioakumulacji (BAF) w dowolnym momencie podczas etapu absorpcji w trakcie opisanego tu badania bioakumulacji stanowi stężenie badanej substancji chemicznej w/na badanym organizmie (C_a wyrażone w $g \cdot kg^{-1}$ suchej masy organizmu) podzielone przez stężenie substancji chemicznej w otaczającym środowisku (C_s wyrażone jako $g \cdot kg^{-1}$ suchej masy gleby); współczynnik bioakumulacji wyraża się w jednostkach $kg \text{ gleby} \cdot kg^{-1}$ organizmu.

Współczynnik bioakumulacji w stanie ustalonym (BAF_{ss}) to współczynnik bioakumulacji w stanie ustalonym, który nie zmienia się w znaczący sposób przez długi okres czasu, a stężenie badanej substancji chemicznej w otaczającym środowisku (C_s wyrażane jako $g \cdot kg^{-1}$ suchej masy gleby) jest podczas tego okresu stałe.

Współczynniki bioakumulacji obliczane bezpośrednio na podstawie stosunku stałej szybkości absorpcji gleby do stałej szybkości eliminacji (k_s oraz k_e , zob. poniżej) nazywa się kinetycznymi współczynnikami bioakumulacji (BAF_k).

Współczynnik akumulacji biota-gleba (BSAF) stanowi stężenie badanej substancji chemicznej o znormalizowanym poziomie lipidów w/na organizmie badanym, podzielone przez stężenie badanej substancji chemicznej o znormalizowanym poziomie węgla organicznego w glebie w stanie ustalonym. C_a w takim przypadku wyraża się jako $g \cdot kg^{-1}$ zawartości lipidów w organizmie, a C_s jako $g \cdot kg^{-1}$ zawartości węgla organicznego w glebie; współczynnik akumulacji biota-gleba wyraża się w $kg \text{ węgla organicznego} \cdot kg^{-1}$ lipidów.

Plateau lub **stan ustalony** określa się jako równowagę między procesem absorpcji a procesem eliminacji, które zachodzą równoległe podczas etapu narażenia. Stan ustalony zostaje osiągnięty na wykresie współczynnika bioakumulacji w czasie w momencie, kiedy krzywa staje się równoległa do osi czasu, a trzy następujące po sobie analizy współczynnika bioakumulacji, wykonane na próbkach pobranych w odstępach co najmniej dwóch dni, różnią się od siebie nie więcej niż w 20 % i między trzema okresami pobierania próbek nie ma statystycznie istotnych różnic. W przypadku badanych substancji chemicznych, które wolno ulegają absorpcji, bardziej odpowiednie będą odstępy czasowe wynoszące siedem dni (49).

Współczynnik podziału węgiel organiczny-woda (K_{oc}) to stosunek stężenia substancji chemicznej w/na frakcji węgla organicznego gleby i stężenia substancji chemicznej w wodzie w warunkach równowagi.

Współczynnik podziału oktanol-woda (K_{ow}) jest to stosunek rozpuszczalności substancji chemicznej w n-oktanolu i wodzie w warunkach równowagi, określane czasami także jako P_{ow} . Logarytm K_{ow} ($\log K_{ow}$) wykorzystuje się jako wskaźnik zdolności substancji chemicznej do bioakumulacji w organizmach wodnych.

Etap absorpcji lub narażenia to czas, w trakcie którego organizmy badane poddaje się narażeniu na działanie badanej substancji chemicznej.

Stała szybkości absorpcji gleby (k_s) stanowi wartość liczbową określającą szybkość wzrostu stężenia jednostki badanej w/na organizmie badanym, wynikającego z etapu absorpcji substancji z gleby. k_s wyraża się jako $g \text{ gleby} \cdot kg^{-1} \text{ organizmu} \cdot d^{-1}$.

Etap eliminacji to czas następujący po przeniesieniu organizmów badanych z zanieczyszczonego środowiska do środowiska niezawierającego jednostki badanej, kiedy to bada się eliminację (lub stratę netto) substancji chemicznej z organizmów badanych.

Stała szybkości eliminacji (k_e) stanowi wartość liczbową określającą szybkość zmniejszania się stężenia jednostki badanej w/na organizmie badanym, po przeniesieniu organizmów badanych ze środowiska zawierającego jednostkę badaną do środowiska niezawierającego danej substancji chemicznej; k_e wyraża się jako d^{-1} .

Badana substancja chemiczna: jakakolwiek substancja lub mieszanina badana za pomocą niniejszej metody badawczej.

Dodatek 2

Obliczanie parametrów absorpcji i eliminacji

Głównym punktem końcowym badania bioakumulacji jest współczynnik bioakumulacji. Zmierzony współczynnik bioakumulacji można obliczyć poprzez podzielenie stężenia w organizmie badanym, C_a , przez stężenie w glebie, C_s , w stanie ustalonym. Jeśli podczas etapu absorpcji nie osiągnięto stanu ustalonego, oblicza się kinetyczny współczynnik bioakumulacji na podstawie stałych szybkości zamiast współczynnika bioakumulacji w stanie ustalonym. Należy jednak zwrócić uwagę, czy współczynnik bioakumulacji jest oparty na stężeniach w stanie ustalonym, czy też nie.

Kinetyczny współczynnik bioakumulacji, stałą szybkości absorpcji (k_s) i stałą szybkości eliminacji (k_e) uzyskuje się zazwyczaj poprzez zastosowanie komputerowych, nieliniowych metod estymacji parametrycznej, np. na podstawie modeli opisanych w (68). Jeśli przyjąć zestaw danych dotyczących czasu sekwencyjnego stężenia i równania modelowe:

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s (1 - e^{-k_e t}) \quad 0 < t < t_c \quad [\text{równanie 1}]$$

lub

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s (e^{-k_e(t-t_c)} - e^{-k_e t}) \quad t > t_c \quad [\text{równanie 2}]$$

gdzie:

C_a = stężenie substancji chemicznej w organizmach [g kg⁻¹ masy mokrej lub suchej],

k_s = stała szybkości absorpcji w tkance [g gleby kg⁻¹ organizmu d⁻¹],

C_s = stężenie substancji chemicznej w glebie [g kg⁻¹ masy mokrej lub suchej],

k_e = stała szybkości eliminacji [d⁻¹],

t_c = czas na koniec etapu absorpcji,

takie programy komputerowe obliczają wartości dla kinetycznego współczynnika bioakumulacji, k_s i k_e .

Gdy stężenie tła w organizmach nienarażonych na działanie substancji, np. w dniu 0, różni się znacznie od zera (taka sytuacja może pojawić się na przykład w przypadku metali), takie stężenie tła ($C_{a,0}$) należy uwzględnić w takich równaniach, aby wyglądały one następująco:

$$C_a = C_{a,0} + \frac{k_s}{k_e} \times C_s (1 - e^{-k_e t}) \quad 0 < t < t_c \quad [\text{równanie 3}]$$

oraz

$$C_a = C_{a,0} + \frac{k_s}{k_e} \times C_s (e^{-k_e(t-t_c)} - e^{-k_e t}) \quad t > t_c \quad [\text{równanie 4}]$$

W przypadku zaobserwowania podczas etapu absorpcji znaczącego spadku w czasie stężenia badanej substancji chemicznej w glebie, należy zastosować następujące modele, np. (67) (79):

$$C_s = C_0 (e^{-k_0 t}) \quad [\text{równanie 5}]$$

gdzie:

C_s = stężenie substancji chemicznej w glebie [g kg⁻¹ masy mokrej lub suchej],

k_0 = stała szybkości rozkładu w glebie [d⁻¹],

C_0 = początkowe stężenie substancji chemicznej w glebie [g kg⁻¹ masy mokrej lub suchej].

$$C_a = \frac{k_s}{k_e - k_0} \times (e^{-k_0 t} - e^{-k_e t}) \quad 0 < t < t_c \quad [\text{równanie 6}]$$

$$C_a = \frac{k_s}{k_e - k_0} \times e^{-k_0 t} - e^{-k} e^{t} * e^{-k(t-t_c)} \quad t > t_c \quad [\text{równanie 7}]$$

gdzie:

C_a = stężenie substancji chemicznej w organizmach [g kg⁻¹ masy mokrej lub suchej],

k_s = stała szybkości absorpcji w tkance [g gleby kg⁻¹ organizmu d⁻¹],

k_0 = stała szybkości rozkładu w glebie [d⁻¹],

k_e = stała szybkości eliminacji [d⁻¹],

t_c = czas na koniec etapu absorpcji.

W przypadku osiągnięcia podczas etapu absorpcji stanu ustalonego (tj. $t = \infty$) równanie 1

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s (1 - e^{-k} e^t) \quad 0 < t < t_c \quad [\text{równanie 1}]$$

można zredukować do:

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s$$

lub

$$C_a/C_s = k_s/k_e = \text{BAF}_K \quad [\text{równanie 8}]$$

Stężenie jednostki badanej w tkance organizmu w stanie ustalonym ($C_{a,ss}$) oblicza się wtedy za pomocą $k_s/k_e \times C_s$.

Współczynnik akumulacji biota-gleba można obliczyć w następujący sposób:

$$\text{BSAF} = \text{BAF}_K * \frac{f_{oc}}{f_{lip}} \quad [\text{równanie 9}]$$

gdzie f_{oc} stanowi frakcję węgla organicznego w glebie, a f_{lip} frakcję lipidów w organizmie, przy czym wartości te należy określić na podstawie próbek pobranych z badania oraz, odpowiednio, na podstawie masy suchej lub mokrej.

Kinetykę eliminacji można modelować za pomocą danych z etapu eliminacji oraz poprzez zastosowanie następującego modelu równania oraz komputerowej, nieliniowej metody estymacji parametrycznej. Jeśli dane pomiarowe wykreślone w czasie wskazują na stały wykładniczy spadek stężenia jednostki badanej w zwierzętach, do opisanego przebiegu eliminacji w czasie można zastosować model jednopredziałowy (równanie 9).

$$C_a(t) = C_{a,ss} \times e^{-k} e^t \quad [\text{równanie 10}]$$

Procesy eliminacji czasami okazują się dwufazowe, wykazując szybki spadek C_a na wczesnych etapach, który zmienia się w wolniejszą stratę jednostek badanych na późniejszych etapach eliminacji, np. (27) (68). Takie dwa etapy można interpretować, zakładając, że w organizmie istnieją dwa różne przedziały, z których jednostka badana jest eliminowana z różną szybkością. W takich przypadkach należy przeanalizować odnośną literaturę, np. (38) (39) (40) (78).

Przy zastosowaniu modeli równań przedstawionych powyżej parametry kinetyczne (k_s i k_e) można obliczyć również za jednym razem, stosując model kinetyki reakcji pierwszego rzędu do wszystkich danych z etapu absorpcji i eliminacji jednocześnie. Aby poznać opis metody, która pozwala na takie połączone obliczanie stałych szybkości absorpcji i eliminacji, można zapoznać się z pozycjami w bibliografii (41), (73) i (70).

$$C_a = \left[\frac{K_s}{K_e} \cdot C_s (1 - e^{-k_e t}) \times (m = 1) \right] + \left[\frac{K_s}{k_e} \times C_s (e^{-k_e(t-t_c)} - e^{-k_e t}) \times (m = 2) \right] \quad [\text{równanie 11}]$$

Uwaga: Jeśli parametry absorpcji i eliminacji szacuje się jednocześnie na podstawie połączonych danych z etapu absorpcji i eliminacji, »m« w równaniu 11 stanowi deskryptor, który umożliwia programowi komputerowemu przypisanie pod-terminów równania do zestawów danych z odpowiedniego etapu oraz poprawne przeprowadzenie oceny ($m = 1$ dla etapu absorpcji, $m = 2$ dla etapu eliminacji).

Niemniej jednak takie modele równań należy stosować z ostrożnością, zwłaszcza jeśli podczas badania zachodzą zmiany w biodostępności badanej substancji chemicznej, biodegradacja lub rozkład (zob. np. (79)).

Dodatek 3

PRZYKŁADOWE HARMONOGRAMY BADAŃ BIOAKUMULACJI W GLEBIE

Badanie z wykorzystaniem dżdżownic

a) Etap absorpcji z pobieraniem próbek w 8 datach na potrzeby obliczenia kinetyki

| Dzień | Czynność |
|----------|--|
| -6 | kondycjonowanie przygotowanej gleby przez 48 godzin; |
| -4 | wzbogacenie frakcji gleby roztworem substancji chemicznej; odparowanie wszelkich rozpuszczalników; wymieszanie składników gleby; rozprowadzenie gleby do naczyń do badania; osiągnięcie równowagi w warunkach badania – 4 dni (3 tygodnie w przypadku gleby wzbogaconej metalem); |
| -3 do -1 | oddzielenie organizmów badanych od kultury w celu ich aklimatyzacji; przygotowanie i nawilżenie składników gleby; |
| 0 | pomiar temperatury i pH gleby; usunięcie próbek gleby z naczyń poddawanych działaniu substancji oraz kontroli rozpuszczalnika w celu określenia stężenia badanej substancji chemicznej; dodanie porcji pożywienia; zważenie i randomizowane rozprowadzenie organizmów do naczyń do badania; zachowanie wystarczającej liczby podpróbek organizmów na potrzeby określenia analitycznych wartości dotyczących tła, masy mokrej i suchej oraz zawartości lipidów; zważenie wszystkich naczyń do badania w celu kontrolowania wilgotności gleby; skontrolowanie dopływu powietrza, jeśli stosuje się zamknięty system badania; |
| 1 | skontrolowanie dopływu powietrza, odnotowanie zachowań organizmów i temperatury; pobranie próbek gleby i organizmów w celu określenia stężenia jednostki badanej; |
| 2 | takie jak w dniu 1; |
| 3 | skontrolowanie dopływu powietrza, zachowań organizmów i temperatury; |
| 4 | takie jak w dniu 1; |
| 5-6 | takie jak w dniu 3; |
| 7 | takie jak w dniu 1; dodanie porcji pożywienia; kontrola wilgotności gleby poprzez ponowne zważenie naczyń do badania oraz uzupełnienie odparowanej wody; |
| 8-9 | takie jak w dniu 3; |
| 10 | takie jak w dniu 1; |
| 11-13 | takie jak w dniu 3; |
| 14 | takie jak w dniu 1; dodanie porcji pożywienia; kontrola wilgotności gleby poprzez ponowne zważenie naczyń do badania oraz uzupełnienie odparowanej wody; |
| 15-16 | takie jak w dniu 3; |
| 17 | takie jak w dniu 1; |
| 18-20 | takie jak w dniu 3; |
| 21 | takie jak w dniu 1; pomiar temperatury i pH gleby; kontrola wilgotności gleby poprzez ponowne zważenie naczyń do badania; koniec etapu absorpcji; przeniesienie organizmów z pozostałych poddawanych narażeniu replikatów do naczyń zawierających czystą glebę w celu rozpoczęcia etapu eliminacji (bez wypróżniania się organizmów); pobranie próbek gleby i organizmów z kontroli rozpuszczalnika. |
| | Czynności wykonywane przed narażeniem (etap osiągnięcia równowagi) należy zaplanować w czasie, uwzględniając właściwości badanej substancji chemicznej. |
| | Czynności opisane dla dnia 3 należy wykonywać codziennie (przynajmniej w dni robocze). |

b) Etap eliminacji

| Dzień | Czynność |
|----------------------------|---|
| -6 | przygotowanie i nawilżenie składników gleby; kondycjonowanie przygotowanej gleby przez 48 godzin; |
| -4 | wymieszanie składników gleby; rozprowadzenie gleby do naczyń do badania; inkubacja w warunkach badania przez 4 dni; |
| 0 (koniec etapu absorpcji) | pomiar temperatury i pH gleby; ważenie i randomizowane rozprowadzenie organizmów do naczyń do badania; dodanie porcji pożywienia; przeniesienie organizmów z pozostałych poddawanych narażeniu replikatów do naczyń zawierających czystą glebę; pobranie próbek gleby i organizmów po 4–6 godzinach w celu określenia stężenia badanej substancji chemicznej; |
| 1 | skontrolowanie dopływu powietrza, odnotowanie zachowań organizmów i temperatury; pobranie próbek gleby i organizmów w celu określenia stężenia badanej substancji chemicznej; |
| 2 | takie jak w dniu 1; |
| 3 | skontrolowanie dopływu powietrza, zachowań organizmów i temperatury; |
| 4 | takie jak w dniu 1; |
| 5–6 | takie jak w dniu 3; |
| 7 | takie jak w dniu 1; dodanie porcji pożywienia; kontrola wilgotności gleby poprzez ponowne zważenie naczyń do badania oraz uzupełnienie odparowanej wody; |
| 8–9 | takie jak w dniu 3; |
| 10 | takie jak w dniu 1; |
| 11–13 | takie jak w dniu 3; |
| 14 | takie jak w dniu 1; dodanie porcji pożywienia; kontrola wilgotności gleby poprzez ponowne zważenie naczyń do badania oraz uzupełnienie odparowanej wody; |
| 15–16 | takie jak w dniu 3; |
| 17 | takie jak w dniu 1; |
| 18–20 | takie jak w dniu 3; |
| 21 | takie jak w dniu 1; pomiar temperatury i pH gleby; kontrola wilgotności gleby poprzez ponowne zważenie naczyń do badania; pobranie próbek gleby i organizmów z kontroli rozpuszczalnika. |
| | Przygotowanie gleby przed rozpoczęciem etapu eliminacji należy przeprowadzać w taki sam sposób, w jaki miało to miejsce w przypadku etapu absorpcji. |
| | Czynności opisane dla dnia 3 należy wykonywać codziennie (przynajmniej w dni robocze). |

Badanie z wykorzystaniem wazonkowcowatych

a) Etap absorpcji z pobieraniem próbek w 8 datach na potrzeby obliczenia kinetyki

| Dzień | Czynność |
|-------|---|
| -6 | kondycjonowanie przygotowanej gleby przez 48 godzin; |
| -4 | wzbogacanie frakcji gleby roztworem substancji chemicznej; odparowanie wszelkich rozpuszczalników; wymieszanie składników gleby; rozprowadzenie gleby do naczyń do badania; osiągnięcie równowagi w warunkach badania – 4 dni (3 tygodnie w przypadku gleby wzbogaconej metalem); |

| Dzień | Czynność |
|----------|--|
| -3 do -1 | oddzielenie organizmów badanych od kultury w celu ich aklimatyzacji; przygotowanie i nawilżenie składników gleby; |
| 0 | pomiar temperatury i pH gleby; usunięcie próbek gleby z naczyń poddawanych działaniu substancji oraz kontroli rozpuszczalnika w celu określenia stężenia badanej substancji chemicznej; dodanie porcji pożywienia; zważenie i randomizowane rozprowadzenie organizmów do naczyń do badania; zachowanie wystarczającej liczby podpróbek organizmów na potrzeby określenia analitycznych wartości dotyczących tła, masy mokrej i suchej oraz zawartości lipidów; zważenie wszystkich naczyń do badania w celu kontrolowania wilgotności gleby; skontrolowanie dopływu powietrza, jeśli stosuje się zamknięty system badania; |
| 1 | skontrolowanie dopływu powietrza, odnotowanie zachowań organizmów i temperatury; pobranie próbek gleby i organizmów w celu określenia stężenia jednostki badanej; |
| 2 | takie jak w dniu 1; |
| 3 | skontrolowanie dopływu powietrza, zachowań organizmów i temperatury; |
| 4 | takie jak w dniu 1; |
| 5-6 | takie jak w dniu 3; |
| 7 | takie jak w dniu 1; dodanie porcji pożywienia; kontrola wilgotności gleby poprzez ponowne zważenie naczyń do badania oraz uzupełnienie odparowanej wody; |
| 9 | takie jak w dniu 1; |
| 10 | takie jak w dniu 3; |
| 11 | takie jak w dniu 1; |
| 12-13 | takie jak w dniu 3; |
| 14 | takie jak w dniu 1; dodanie porcji pożywienia; pomiar temperatury i pH gleby; kontrola wilgotności gleby poprzez ponowne zważenie naczyń do badania; koniec etapu absorpcji; przeniesienie organizmów z pozostałych poddawanych narażeniu replikatów do naczyń zawierających czystą glebę w celu rozpoczęcia etapu eliminacji (bez wypróżniania się organizmów); pobranie próbek gleby i organizmów z kontroli rozpuszczalnika. |
| | Czynności wykonywane przed narażeniem (etap osiągnięcia równowagi) należy zaplanować w czasie, uwzględniając właściwości badanej substancji chemicznej. |
| | Czynności opisane dla dnia 3 należy wykonywać codziennie (przynajmniej w dni robocze). |

Dodatek 4

Gleba sztuczna – zalecenia dotyczące jej przygotowania i przechowywania

Jako że gleby naturalne z konkretnego źródła mogą nie być dostępne przez cały rok, a organizmy rodzime oraz obecność mikrozanieczyszczeń mogą mieć wpływ na badanie, w opisanym tu badaniu zaleca się stosowanie podłoża sztucznego, sztucznej gleby zgodnie z rozdziałem C.8 niniejszego załącznika, Toksyczność dla dżdżownic (48). W takiej glebie przeżyć, rozwijać się i rozmnażać może kilka gatunków badanych, a także zapewnia się w ten sposób maksymalną standaryzację oraz porównywalność warunków badania i hodowli w ramach danego laboratorium oraz między laboratoriami.

Składniki gleby

| | | |
|-------------------|-------|---|
| Torf: | 10 % | Torf z rozkładu torfowca (<i>Sphagnum</i>), zgodnie z wytyczną OECD nr 207 (48); |
| Piasek kwarcowy: | 70 % | Przemysłowy piasek kwarcowy (wysuszony powietrzem); wielkość ziaren: ponad 50 % cząstek powinna mieścić się w przedziale 50–200 µm, ale wszystkie cząstki powinny być ≤ 2 mm; |
| Glinka kaolinowa: | 20 % | Zawartość kaolinitu ≥ 30 %; |
| Węgiel wapnia: | ≤ 1 % | CaCO ₃ , sproszkowany, chemicznie czysty. |

Opcjonalnie zawartość węgla organicznego w glebie sztucznej można zmniejszyć, np. poprzez obniżenie zawartości torfu do 4–5 % suchej gleby oraz odpowiednie zwiększenie zawartości piasku. Dzięki takiemu zmniejszeniu zawartości węgla organicznego mogą zmniejszyć się możliwości adsorpcji badanej substancji chemicznej do gleby (węgiel organiczny), a dostępność badanej substancji chemicznej dla organizmów może wzrosnąć (74). Wykazano, że gatunki *Enchytraeus albidus* i *Eisenia fetida* mogą spełniać warunki ważności dotyczące rozmnażania, jeśli bada się je w glebach naturalnych o niższej zawartości węgla organicznego, np. 2,7 % (33) (61), oraz istnieją doświadczenia pokazujące, że pozwala na to również zastosowanie gleby sztucznej przy zawartości torfu na poziomie 5 %.

Przygotowanie

Suche składniki gleby dokładnie się miesza (np. w dużym mieszalniku laboratoryjnym). Taką czynność należy przeprowadzić około tygodnia przed rozpoczęciem badania. Wymieszane suche składniki gleby należy nawilżyć dejonizowaną wodą co najmniej 48 godzin przed zastosowaniem badanej jednostki, w celu wyrównania/stabilizacji kwasowości. W celu określenia pH stosuje się mieszaninę gleby i roztworu 1 M KCl w stosunku 1:5. Jeśli wartość pH nie mieści się w wymaganym przedziale (6,0 ± 0,5), do gleby dodaje się odpowiednią ilość CaCO₃ lub przygotowuje się nową partię gleby.

Maksymalną zdolność zatrzymywania wody gleby sztucznej określa się zgodnie z ISO 11268-2 (35). Co najmniej dwa dni przed rozpoczęciem badania suchą glebę sztuczną nawilża się poprzez dodanie odpowiedniej ilości wody dejonizowanej lub regenerowanej w celu uzyskania około połowy końcowej zawartości wody. Końcowa zawartość wody powinna wynosić 40–60 % maksymalnej zdolności zatrzymywania wody. Na początku badania uprzednio nawilżoną glebę dzieli się na liczbę partii odpowiadającą liczbie badanych stężeń oraz kontroli zastosowanych w badaniu, a zawartość wilgoci dostosowuje się do poziomu 40–60 % maksymalnej zdolności zatrzymywania wody poprzez zastosowanie roztworu jednostki badanej lub poprzez dodanie wody dejonizowanej lub regenerowanej. Zawartość wilgoci określa się na początku i na końcu badania (przy temperaturze 105 °C). Zawartość wilgoci powinna być optymalna dla wymogów dotyczących danego gatunku (zawartość wilgoci sprawdza się w następujący sposób: jeśli glebę delikatnie ściśnie się w dłoni, między palcami powinny pojawić się kropelki wody).

Przechowywanie

Suche składniki gleby sztucznej można, do czasu ich wykorzystania, przechowywać w temperaturze pokojowej. Przygotowaną i uprzednio nawilżoną glebę można przed wzbogaceniem przechowywać w chłodnym miejscu przez maksymalny okres trzech dni; należy dołożyć starań, by zminimalizować odparowanie wody. Glebę wzbogaconą jednostką badaną należy zastosować niezwłocznie, chyba że istnieją informacje wskazujące, że daną glebę można przechowywać bez wpływu dla toksyczności i biodostępności jednostki badanej. Próbkę wzbogaconej gleby można następnie, do czasu ich analizy, przechowywać w warunkach zalecanych dla danej jednostki badanej.

Dodatek 5

Gatunki skąposzczetów lądowych zalecane do wykorzystania w badaniu bioakumulacji z gleby**Dżdżownice**

Zaleca się wykorzystanie w badaniu gatunku *Eisenia fetida* (Savigny 1826), należącego do rodziny dżdżownicowatych. Od 1972 r. rozróżnia się dwa podgatunki tego gatunku (*Eisenia fetida* i *Eisenia andrei* (10)). Według Jaenike (36) są to dwa prawdziwie osobne gatunki. *Eisenia fetida* można łatwo rozpoznać dzięki jej jasnym żółtym paskom między segmentami, zaś *Eisenia andrei* charakteryzuje się jednolitą ciemnoczerwoną barwą. Gatunki te pochodzą prawdopodobnie z regionu Morza Czarnego, a obecnie występują na całym świecie, zwłaszcza w siedliskach modyfikowanych przez działalność człowieka, na przykład w przyzmacach kompostowych. Organizmy obydwu tych gatunków można wykorzystywać do badań ekotoksykologicznych i badań bioakumulacji.

Eisenia fetida i *Eisenia andrei* są dostępne na rynku, np. jako przynęta na ryby. W porównaniu z innymi dżdżownicami z rodziny dżdżownicowatych organizmy te mają krótki cykl życia i osiągają dojrzałość w ciągu ok. 2–3 miesięcy (w temperaturze pokojowej). Optymalną dla nich temperaturą jest ok. 20–24 °C. Gatunki te preferują względnie wilgotne podłoża z prawie neutralnym pH oraz wysoką zawartością materiału organicznego. Jako że od około 25 lat powszechnie wykorzystuje się je w zestandaryzowanych badaniach ekotoksykologicznych, ich hodowla jest dobrze opisana (48) (77).

Obydwa gatunki można hodować w różnych odchodach zwierzęcych. Pożywką hodowlaną zalecaną przez ISO (35) jest mieszanina obornika końskiego lub krowiego oraz torfu w stosunku 50:50. Taka pożywka powinna mieć wartość pH na poziomie około 6 do 7 (regulowane węglanem wapnia), niskie przewodnictwo jonowe (niższe niż 6 mS/cm lub niższe niż 0,5 % stężenia soli) oraz nie powinna być zbyt zanieczyszczona amoniakiem lub zwierzęcym moczem. Można także zastosować dostępną na rynku glebę ogrodniczą niezawierającą dodatków lub też glebę sztuczną zgodnie z OECD (48), lub też mieszaninę takich dwóch gleb w proporcji 50:50. Podłoże powinno być wilgotne, ale nie zbyt mokre. Do hodowli odpowiednie są skrzynki hodowlane o pojemności od 10 do 50 litrów.

Aby uzyskać organizmy o standardowym wieku i masie, hodowlę najlepiej rozpocząć z zastosowaniem kokonów. W tym celu dorosłe organizmy dodaje się do skrzynki hodowlanej zawierającej świeże podłoże w celu wytworzenia kokonów. Doświadczenie pokazuje, że dobre wskaźniki rozmnażania uzyskuje się przy zagęszczeniu na poziomie około 100 dorosłych organizmów na kg podłoża (masa mokra). Po 28 dniach usuwa się dorosłe organizmy. Dżdżownice wyklute z kokonów wykorzystuje się do badania w chwili, gdy osiągną one dojrzałość po co najmniej 2 miesiącach, lecz nie dłużej niż po 12 miesiącach.

Organizmy z gatunków opisanych powyżej można uznać za zdrowe, jeśli przekopują się przez podłoże, nie próbują opuścić podłoża oraz rozmnażają się w sposób ciągły. Bardzo powolne poruszanie się lub żółta tylna końcówka (w przypadku *Eisenia fetida*) wskazują na zużycie podłoża. W takim przypadku zaleca się zastosowanie świeżego podłoża lub mniejszej liczby zwierząt na jedną skrzynkę.

Dodatkowa wybrana bibliografia

Gerard BM (1964). Synopsis of the British fauna. No. 6 Lumbricidae. Linnean Soc. Londyn, 6: 1–58.

Graff O (1953). Die Regenwürmer Deutschlands. Schr. Forsch. Anst. Landwirtsch. 7: 1–81.

Römbke J, Egeler P, Füll C (1997). Literaturstudie über Bioakkumulationstests mit Oligochaeten im terrestrischen Medium. Bericht für das UBA F + E 206 03 909, 86 S.

Rundgren S (1977). Seasonality of emergence in lumbricids in southern Sweden. Oikos 28: 49–55.

Satchell JE (1955). Some aspects of earthworm ecology. Soil Zoology (Kevan): 180–201.

Sims RW and Gerard BM (1985). A synopsis of the earthworms. Linnean Soc. Londyn 31: 1–171.

Tomlin AD (1984). The earthworm bait market in North America. In: Earthworm Ecology – from Darwin to vermiculture. Satchell, J.E. (ed.), Chapman & Hall, Londyn. 331–338 s.

Wazonkowcowate

Zaleca się wykorzystanie w badaniu gatunku *Enchytraeus albidus* Henle 1837. *Enchytraeus albidus* jest jednym z największych (do 15 mm) gatunków z rodziny wazonkowcowatych, typ: pierścienice, klasa: skąposzczety, oraz występuje na całym świecie (8). Organizmy tego gatunku można spotkać w siedliskach morskich, limnicznych i lądowych, głównie w rozkładającej się materii organicznej (wodorosty, kompost), oraz rzadziej także na łąkach (42). Ta duża tolerancja ekologiczna oraz niektóre odmiany morfologiczne wskazują, że w przypadku tego gatunku mogą istnieć różne rasy.

Enchytraeus albidus jest dostępny na rynku, sprzedawany jako pokarm dla ryb. Należy sprawdzić, czy kultura nie jest zanieczyszczona innymi, zazwyczaj mniejszymi, gatunkami (60). Jeśli takie zanieczyszczenie występuje, wszystkie organizmy badane należy umyć w wodzie na szalkach Petriego. Następnie w celu rozpoczęcia nowej kultury wybiera się duże

dorośle osobniki z gatunku *Enchytraeus albidus* (z pomocą mikroskopu stereoskopowego). Wszystkie inne organizmy odrzuca się. Cykl życia tego gatunku jest krótki i organizmy osiągają dojrzałość w okresie od 33 dni (przy temperaturze 18 °C) do 74 dni (przy temperaturze 12 °C). W badaniu należy wykorzystać wyłącznie kultury przechowywane w laboratorium przez okres co najmniej 5 tygodni bez żadnych problemów (jedno pokolenie).

Inne gatunki z rodzaju *Enchytraeus* również nadają się do wykorzystania w badaniu, zwłaszcza *Enchytraeus luxuriosus*. Organizmy tego gatunku są prawdziwymi mieszkańcami gleby, co zostało opisane w (65). W przypadku wykorzystania innych gatunków *Enchytraeus* należy je wyraźnie zidentyfikować oraz przedstawić uzasadnienie wyboru gatunku.

Enchytraeus crypticus (Westheide & Graefe 1992) jest gatunkiem należącym do tej samej grupy co *Enchytraeus luxuriosus*. Nie ma pewności, czy gatunek ten żyje na polach, jako że jego opisy dotyczą wyłącznie kultur dżdżownic i przyz kompostowych (Römbke 2003). Tym samym nieznane są jego pierwotne wymagania ekologiczne. Niemniej jednak niedawne badania laboratoryjne z wykorzystaniem różnych gleb naturalnych potwierdziły, że gatunek ten ma dużą tolerancję na właściwości gleby, takie jak pH i tekstura (Jänsch i in. 2005). Ostatnio gatunek ten często wykorzystuje się w badaniach ekotoksykologicznych z uwagi na łatwość jego hodowli i badania, np. Kuperman i in. 2003). Jednak w porównaniu z *Enchytraeus albidus* jest to gatunek o małym rozmiarze (3–12 mm; średnio 7 mm (Westheide & Müller 1996)), co utrudnia jego stosowanie. Przy wykorzystaniu tego gatunku, zamiast *Enchytraeus albidus*, rozmiar naczyń do badania może być mniejszy, lecz nie musi. Ponadto należy wziąć pod uwagę, że ten gatunek rozmnaża się bardzo szybko i jego czas trwania pokolenia wynosi mniej niż 20 dni przy temperaturze 20 ± 2 °C (Achazi i in. 1999), a nawet krócej w wyższych temperaturach.

Organizmy z gatunku *Enchytraeus albidus* (a także inne gatunki z rodzaju *Enchytraeus*) można hodować w dużych plastikowych skrzyniach (np. o wymiarach 30 × 60 × 10 cm lub 20 × 12 × 8 cm, które są odpowiednie do hodowli organizmów małego rozmiaru) wypełnionych mieszaniną gleby sztucznej i dostępnej na rynku niezanieczyszczonej gleby ogrodowej niezawierającej dodatków. Należy unikać kompostu, ponieważ może on zawierać toksyczne substancje chemiczne, na przykład metale ciężkie. Przed wykorzystaniem gleby hodowlanej należy z niej usunąć faunę poprzez trzykrotne głębokie zamrażanie. Można także wykorzystać czystą glebę sztuczną, jednak szybkość rozmnażania może być wtedy mniejsza niż wyniki uzyskiwane przy zastosowaniu podłoża mieszanego. Podłoże powinno mieć pH na poziomie $6,0 \pm 0,5$. Kulturę przechowuje się w inkubatorze w temperaturze 15 ± 2 °C, bez światła. We wszystkich przypadkach należy unikać temperatury wyższej niż 23 °C. Gleba sztuczna/naturalna powinna być wilgotna, lecz nie mokra. Gdy glebę delikatnie ścisnie się w dłoni, między palcami powinny pojawić się jedynie małe krople wody. We wszystkich przypadkach należy unikać warunków beztlenowych (np. jeśli stosuje się pokrywę, należy wykonać odpowiednią liczbę otworów w pokrywie w celu zapewnienia wystarczającej wymiany powietrza). Gleba hodowlana powinna być napowietrzana poprzez ostrożne wymieszanie jej raz w tygodniu.

Organizmy należy karmić raz w tygodniu *ad libitum* płatkami owsianymi, które umieszcza się w zagłębieniu na powierzchni gleby i przykrywa glebą. Jeśli w pojemniku pozostało pożywienie z poprzedniego karmienia, ilość podawanego pożywienia należy odpowiednio dostosować. Jeśli na pozostałym pożywieniu wyrosły grzyby, należy je wymienić na nową porcję płatków owsianych. W celu stymulowania rozmnażania co dwa tygodnie do płatków owsianych można dodać dostępny na rynku proszek proteinowy z witaminami. Po trzech miesiącach zwierzęta przenosi się do świeżo przygotowanej kultury lub podłoża do hodowli. Płatki owsiane, które należy przechowywać w szczelnie zamkniętych naczyniach, należy autoklawować lub podgrzać, aby uniknąć infekcji przenoszonych przez roztozca żerujące na pokarmach suchych (np. *Glyphagus* sp., Astigmata, Acarina) lub roztozca drapieżne (np. *Hypoaspis (Cosmolaelaps) miles*, Gamasida, Acarina). Po zdezynfekowaniu pożywienie się mieli, aby można je było łatwo rozmieścić na powierzchni gleby. Innym możliwym źródłem pożywienia są drożdże piekarskie lub pokarm dla ryb TetraMin®.

Zasadniczo warunki hodowli są wystarczające, jeśli organizmy nie starają się opuścić podłoża, przekopują się szybko poprzez glebę, mają lśniąca zewnętrzną powłokę bez przyklejających się do niej cząstek gleby, mają mniej więcej białawą barwę oraz jeśli widoczne są organizmy w różnym wieku. Organizmy można uznać za zdrowe, jeśli rozmnażają się w sposób ciągły.

Dodatkowa wybrana bibliografia

Achazi RK, Fröhlich E, Henneken M, Pilz C (1999). The effect of soil from former irrigation fields and of sewage sludge on dispersal activity and colonizing success of the annelid *Enchytraeus crypticus* (Enchytraeidae, Oligochaeta). Newsletter on Enchytraeidae 6: 117–126.

Jänsch S, Amorim MJB, Römbke J (2005). Identification of the ecological requirements of important terrestrial ecotoxicological test species. Environ. Reviews 13: 51–83.

Kuperman RG, Checkai RT, Simini M, Phillips CT, Kolakowski JE, Kurnas CW, Sunahara GI (2003). Survival and reproduction of *Enchytraeus crypticus* (Oligochaeta, Enchytraeidae) in a natural sandy loam soil amended with the nitroheterocyclic explosives RDX and HMX. Pedobiologia 47: 651–656.

Römbke J (2003). Ecotoxicological laboratory tests with enchytraeids: A review. Pedobiologia 47: 607–616.

Westheide W i Graefe U (1992). Two new terrestrial *Enchytraeus* species (Oligochaeta, Annelida). J. Nat. Hist. 26: 479–488.

Westheide W i Müller MC (1996). Cinematographic documentation of enchytraeid morphology and reproductive biology. Hydrobiologia 334: 263–267."